



**Virgínia Maria Ferreira  
Gonçalves**

**Caracterização de Heteropolissacarídeos por  
Espectrometria de Massa**



**Virgínia Maria Ferreira  
Gonçalves**

**Caracterização de Heteropolissacarídeos por  
Espectrometria de Massa**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Química dos Alimentos, realizada sob a orientação científica da Dr<sup>a</sup>. Maria do Rosário Gonçalves dos Reis Marques Domingues, Professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

*Aos meus pais,  
por todo o apoio que me têm dado ao longo desta minha caminhada...*

## **o júri**

presidente

Prof. Doutor Manuel António Coimbra Rodrigues da Silva  
professor associado com agregação da Universidade de Aveiro

Prof. Doutor Fernando Hermínio Ferreira Milheiro Nunes  
professor auxiliar da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

Prof. Doutora Maria do Rosário Gonçalves dos Reis Marques Domingues  
professora auxiliar da Universidade de Aveiro

## **agradecimentos**

Agradeço à Doutora Maria do Rosário G.R.M. Domingues, professora auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro, por me ter proporcionado a oportunidade de desenvolver este trabalho sob a sua orientação científica, pelo animo e pela prontidão com que sempre se dispôs a ajudar-me.

Agradeço ao Doutor Manuel António Coimbra, professor associado com agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro, pela disponibilização das amostras de gelanas para a realização deste trabalho, bem como pela sua ajuda dispensada sempre que solicitada.

Agradeço ao Doutor Dmitry Evtyuguin, professor associado com agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro pela orientação ao nível de procedimentos de extracção e isolamento das xilanas, assim como pelo apoio e incentivo que me foi proporcionando.

Agradeço ao Instituto RAIZ e a Barros e Filhos, Ltd, pelo fornecimento das amostras de madeira.

Agradeço a todos os colegas do Departamento de Química, que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, em especial aos meus colegas do grupo de Espectrometria de Massa, pela ajuda, incentivo e paciência que demonstraram ter para comigo.

Agradeço a todos os meus amigos, pela força e coragem que sempre me deram para conseguir ultrapassar mais esta etapa da minha vida.

Agradeço, de uma forma muito especial, aos meus pais, irmã e cunhado, pelo apoio incondicional.

## palavras-chave

Heteropolissacarídeos; espectrometria de massa; gelanas; xilanas; *Paulowia elongata* / *Paulownia fortunei*

## resumo

O trabalho de investigação elaborado no âmbito desta dissertação de Mestrado, teve como objectivo a aplicação da Espectrometria de Massa (MS) utilizando métodos de ionização por electrospray (ESI) e ionização por desorção por laser assistida por matriz (MALDI), para a caracterização dos heteropolissacarídeos gelanas e xilanas.

Neste trabalho foi efectuada a caracterização de duas gelanas, uma gelana comercial e uma gelana modificada *JB3*, por ESI MS e espectrometria de massa tandem (MS/MS e MS<sup>n</sup>). Os heteropolissacarídeos de ambas as gelanas foram submetidos a hidrólise parcial ácida com TFA e, os oligossacarídeos obtidos foram fraccionados por cromatografia de exclusão molecular. Estes oligossacarídeos foram posteriormente identificados por ESI-MS e, caracterizados por ESI-MS/MS e MS<sup>n</sup>. A caracterização estrutural foi obtida por fragmentação dos iões [M+Na]<sup>+</sup> identificados nos espectro de ESI-MS. Tal análise permitiu identificar em ambas as gelanas, a unidade estrutural típica destes polímeros, a qual é constituída por dois resíduos de Glc, um resíduo de GlcA e um resíduo de Rha, com a sequência GlcGlcAGlcRha. No entanto, verificaram-se também diferenças estruturais entre ambas as gelanas, essencialmente no que diz respeito a grupos substituintes. Assim, verificou-se a presença de grupos glicerato apenas na constituição da gelana modificada, e ausência de grupos acetilo em ambas as gelanas.

Xilanas da madeira de *Paulowia elongata* / *Paulownia fortunei* foram, no âmbito deste trabalho, isoladas a partir da madeira e caracterizadas por análise de açúcares, <sup>1</sup>H RMN e espectrometria de massa (ESI-MS, MS/MS e MALDI-MS). A análise destes resultados revelou que estas xilanas apresentam uma cadeia principal constituída maioritariamente por unidades de (1→4)-β-D-xilopiranosose parcialmente acetiladas e ramificada com resíduos de MeGlcA e GlcA. Para a identificação da estrutura primária da xilana, esta foi sujeita a hidrólise parcial ácida e os xilo-oligossacarídeos (XOS) daí resultantes foram posteriormente separados por LEX-SEC. As fracções obtidas foram analisadas por ESI-MS, MS/MS e MALDI-MS. Nos espectros de ESI-MS foram identificadas séries de XOS neutros de pequeno grau de polimerização (DP) e com diferentes graus de acetilação (Xyl<sub>2-4</sub>Ac<sub>0-3</sub>), e por MALDI-MS foi possível identificar XOS neutros, acetilados e não acetilados com maior DP (Xyl<sub>6-20</sub>Ac<sub>0-9</sub>). Neste trabalho foi possível ainda identificar XOS ácidos, através de ESI-MS e MALDI-MS, correspondentes a três séries distintas de XOS, que se podem representar por: Xyl<sub>1-11</sub>Ac<sub>0-7</sub>MeGlcA; Xyl<sub>5-12</sub>Ac<sub>0-3</sub>MeGlcA<sub>2</sub> e Xyl<sub>6-20</sub>Ac<sub>9-17</sub>MeGlcAGlcA. A identificação de XOS neutros com elevado DP, tais como Xyl<sub>20</sub>Ac<sub>10</sub>, leva-nos a sugerir que os resíduos ácidos se apresentam distribuídos pela cadeia de xilana, de uma forma irregular.

Mais uma vez a espectrometria de massa revelou-se de extrema importância para a identificação e caracterização estrutural de oligossacarídeos.

## keywords

heteropolysaccharides; mass spectrometry; gellans; xylans; *Paulownia elongata* / *Paulownia fortunei*

## abstract

The main purpose of the work developed during this study was the application of mass spectrometry (MS) with ionisation methods of electrospray (ESI) and matrix assisted laser desorption ionisation (MALDI) for the characterisation of the heteropolysaccharides gellans and xylans.

In the present work, we compared two different gellans: a commercial gellan and a modified gellan. These heteropolysaccharides were hydrolysed (by acidic hydrolysis) and the oligosaccharides obtained were fractionated by size exclusion chromatography. The fractions obtained were further analysed by MS. The mass spectrometers used in that analysis were ESI-QTOF and ESI-linear ion trap. The structural characterisation was obtained by the analysis of the MS/MS and MS<sup>n</sup> spectra of [M+Na]<sup>+</sup> ions identified in the ESI-MS spectra. The results showed that both gellans are comprised by a tetrasaccharide repeat unit composed of two molecules of D-glucose (D-Glc), one of L-rhamnose (L-Rha) and one of D-glucuronic acid (D-GlcA), with the following sequence GlcGlcAGlcRha. However some structural differences between the two gellans were detected. The modified gellan showed the presence of glyceryl groups as ramifications, but this is absent in commercial one. Acetyl groups were found to be absent in both gellans.

As a part of this work, xylans were isolated from holocellulose of hybrid *Paulownia elongata* / *Paulownia fortunei* wood with dimethyl sulfoxide. The composition and the structural features of xylan were elucidated by wet chemistry, NMR (1H NMR, TOCSY, HSQC) and by MS. It was found that *Paulownia* xylan backbone is constituted of partially acetylated (1→4)-linked β-D-xylopyranosyl units and substituted with GlcA and/or MeGlcA. To identify xylan primary structure, the isolated xylan was also submitted to acid hydrolysis and xylo-oligosaccharides (XOS) obtained were fractionated by LEX-SEC in fractions that comprise neutral or acidic XOS. Structural characterisation of both neutral and acidic XOS were obtained by mass spectrometry with ESI and MALDI (ESI-MS, ESI-MS/MS and MALDI-MS). The neutral XOS identified by ESI-MS correspond to non-substituted XOS with different acetylation degree (Xyl<sub>2-4</sub>Ac<sub>0-3</sub>). MALDI-MS allowed the identification of neutral XOS with rather higher DP (Xyl<sub>6-20</sub>Ac<sub>0-9</sub>). The acidic fractions, in the ESI-MS and MALDI-MS spectra, revealed the presence of acetylated and non-acetylated acidic XOS, with one and two acidic residues that can be summarized in three different series: Xyl<sub>1-11</sub>Ac<sub>0-7</sub>MeGlcA, Xyl<sub>5-12</sub>Ac<sub>0-3</sub>MeGlcA<sub>2</sub> and Xyl<sub>6-20</sub>Ac<sub>0-17</sub>MeGlcAGlcA. The identification by MALDI-MS of large fragments of neutral XOS, such as Xyl<sub>20</sub>Ac<sub>8</sub>, suggested that the acidic uronic residues may be irregularly distributed along the xylan backbone.

## **ÍNDICE GERAL**

### **AGRADECIMENTOS**

### **RESUMO**

### **ABSTRACT**

<b>ÍNDICE GERAL.....</b>	<b>i</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS.....</b>	<b>iv</b>
<b>ÍNDICE DE TABELAS.....</b>	<b>vii</b>
<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>viii</b>

## **CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO**

1.1. Espectrometria de massa.....	3
1.2. Métodos de ionização.....	4
1.2.1. Ionização por electrospray (ESI).....	5
1.2.2. Ionização por desorção por laser assistida por matriz (MALDI).....	8
1.3. Analisadores.....	10
1.3.1. Quadrupolo (Q).....	10
1.3.2. Trapa de iões (IT).....	12
1.3.3. Analisador de tempo de voo (TOF).....	13
1.4. Espectrometria de massa tandem.....	16
1.5. Utilização da espectrometria de massa para a análise de açúcares.....	17
1.6. Âmbito do trabalho.....	20

## **CAPÍTULO 2 - CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE GELANAS POR ESPECTROMETRIA DE MASSA**

2.1. Considerações teóricas.....	25
2.2. Material e Métodos.....	28
2.2.1. Amostras.....	28
2.2.2. Análise por metilação e GC-MS.....	29
2.2.3. Espectrometria de massa com ionização por electrospray – ESI-Q-TOF (MS e MS/MS).....	32



2.2.4. Espectrometria de massa com ionização por Electrospray – Trapa de Iões (MS <sup>n</sup> ).....	32
2.3. Resultados e discussão.....	33
2.3.1. Gelana Comercial.....	35
2.3.2. Gelana Modificada – JB3.....	47
2.4. Conclusão.....	52

### **CAPÍTULO 3 – EXTRACÇÃO, ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE XILANAS DA MADEIRA DE *Paulownia* POR ESPECTROMETRIA DE MASSA**

3.1. Considerações teóricas.....	59
3.2. Material e Métodos.....	62
3.2.1. Amostras.....	62
3.2.2. Abate da árvore para estudo.....	62
3.2.3. Preparação do serrim da madeira.....	63
3.2.4. Determinação da humidade relativa.....	63
3.2.5. Extractáveis solúveis em água.....	64
3.2.6. Extractáveis solúveis em acetona.....	64
3.2.7. Deslenhificação com ácido peracético.....	64
3.2.8. Extracção e isolamento das xilanas.....	65
3.2.9. Análise de açúcares neutros das xilanas.....	66
3.2.10. Análise de ácidos urónicos.....	67
3.2.11. Espectroscopia de RMN de protão.....	67
3.2.12. Hidrólise parcial ácida dos xilo-oligossacarídeos.....	68
3.2.13. LEX-SEC.....	68
3.2.14. Espectrometria de massa com ionização por Electrospray – ESI-Q-TOF (MS e MS/MS).....	69
3.2.15. Espectrometria de massa com ionização por MALD (MALDI-MS).....	69
3.3. Resultados e discussão.....	70
3.3.1. Análise por ESI-MS e MALDI-MS.....	76
3.3.2. Análise por ESI-MS/MS.....	84

3.4. Conclusão.....	88
<b>CAPÍTULO 4 – CONCLUSÃO.....</b>	<b>93</b>
<b>CAPÍTULO 5 – PERSPECTIVAS DE ESTUDOS FUTUROS.....</b>	<b>97</b>
<b>CAPÍTULO 6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>101</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.1.</b> Componentes principais que fazem parte de um espectrómetro de massa, que consiste numa fonte de ionização, seguida de um analisador de massa e um detector. É ainda utilizado um computador para gerar os espectros de massa a partir dos sinais emitidos pelo detector (Kicman <i>et al.</i> , 2007).....	<b>3</b>
<b>Figura 1.2.</b> Esquema ilustrativo do processo de ionização por electrospray operando em modo positivo (Cech <i>et al.</i> , 2001).....	<b>7</b>
<b>Figura 1.3.</b> Representação esquemática de uma fonte de ionização por electrospray (Griffiths <i>et al.</i> , 2001).....	<b>8</b>
<b>Figura 1.4.</b> Ionização do analito por MALDI. O cristal formado pela matriz e o analito é irradiado por um laser, o qual provoca o processo de desorção seguido de dessolvatação. Os iões então formados são direccionados por acção de uma diferença de potencial para o analisador (Kicman <i>et al.</i> , 2007).....	<b>9</b>
<b>Figura 1.5.</b> Esquema representativo de um analisador do tipo quadrupólo ( <a href="http://www.waters.com">http://www.waters.com</a> ).....	<b>11</b>
<b>Figura 1.6.</b> Representação esquemática de um analisador do tipo trapa de iões (Kicman <i>et al.</i> , 2007).....	<b>12</b>
<b>Figura 1.7.</b> Representação esquemática de um analisador de tempo de voo: A) operando em modo linear; B) operando em modo reflectrão ( <a href="http://www.waters.com">http://www.waters.com</a> ).....	<b>15</b>
<b>Figura 2.1.</b> Exopolissacarídeos da família das gelanas (Banik <i>et al.</i> , 2000).....	<b>26</b>
<b>Figura 2.2</b> – Estrutura química de uma gelana nativa.....	<b>27</b>
<b>Figura 2.3.</b> Cromatografia de exclusão molecular em Biogel P2 de: <b>A)</b> gelana comercial e <b>B)</b> gelana modificada <i>JB3</i> .....	<b>29</b>
<b>Figura 2.4.</b> Espectro de ESI-MS obtido para: A) Fracção 8 da gelana comercial; B) Fracção 17 da gelana modificada.....	<b>35</b>
<b>Figura 2.5.</b> Espectro de ESI-MS/MS do ião de $m/z$ 687, obtido num ESI-Q-TOF.....	<b>36</b>

<b>Figura 2.6.</b> Espectro de ESI-MS <sup>n</sup> obtido para o ião de $m/z$ 687 numa trapa de iões.....	<b>37</b>
<b>Figura 2.7.</b> Espectro de ESI-MS/MS do ião de $m/z$ 525, obtido num ESI-Q-TOF.....	<b>38</b>
<b>Figura 2.8.</b> Espectro de ESI-MS/MS do ião de $m/z$ 541, obtido num ESI-Q-TOF.....	<b>39</b>
<b>Figura 2.9.</b> Espectro de ESI-MS/MS do ião de $m/z$ 833, obtido num ESI-Q-TOF.....	<b>40</b>
<b>Figura 2.10.</b> Espectros de ESI-MS <sup>n</sup> obtidos num analisador de trapa de iões, para as três diferentes vias de fragmentação encontradas para o ião $m/z$ 833.....	<b>42</b>
<b>Figura 2.11.</b> Espectro de ESI-MS/MS relativo ao ião para $m/z$ 849, obtido num ESI-Q-TOF.....	<b>43</b>
<b>Figura 2.12.</b> Espectro de ESI-MS/MS do ião de $m/z$ 1025, obtido num ESI-Q-TOF.....	<b>44</b>
<b>Figura 2.13.</b> Espectro de ESI-MS/MS do ião de $m/z$ 1171, obtido num ESI-Q-TOF.....	<b>45</b>
<b>Figura 2.14.</b> Espectro de ESI-MS/MS do ião de $m/z$ 1333 obtido num ESI-Q-TOF.....	<b>46</b>
<b>Figura 2.15.</b> Espectro de ESI-MS/MS do ao ião de $m/z$ 775 obtido num ESI-Q-TOF (* - corresponde a uma segunda via de fragmentação).....	<b>48</b>
<b>Figura 2.16.</b> Espectro de ESI-MS <sup>n</sup> obtido para o ião de $m/z$ 775 numa trapa de iões.....	<b>49</b>
<b>Figura 2.17.</b> Espectro de ESI-MS/MS do ião de $m/z$ 629 obtido num ESI-Q-TOF.....	<b>50</b>
<b>Figura 2.18.</b> Espectro de ESI-MS/MS do ião de $m/z$ 921 obtido num ESI-Q-TOF.....	<b>51</b>
<b>Figura 2.19.</b> Espectro de ESI-MS/MS do ião de $m/z$ 937 obtido num ESI-Q-TOF.....	<b>52</b>
<b>Figura 3.1.</b> Fotografia de um exemplar de árvore de <i>Paulownia elongata</i> / <i>Paulownia fortunei</i> híbrida com aproximadamente 3.5 ano.....	<b>62</b>

<b>Figura 3.2.</b> Esquema representativo da forma de recolha dos toretes para amostragem (toretes com número ímpar, foram recolhidos para amostra; toretes com número para não foram recolhidos; toretes número 2 e 8 foram recolhidos para exposição).....	<b>63</b>
<b>Figura 3.3.</b> Espectro de RMN de protão (D <sub>2</sub> O, 25 °C) das xilanas da madeira de <i>Paulownia elongata</i> / <i>Paulownia fortunei</i> (A) e a região expandida correspondente aos protões anoméricos (B). As impurezas dos solventes encontram-se sinalizadas com um asterisco (*). ....	<b>72</b>
<b>Figura 3.4.</b> Espectro TOCSY (D <sub>2</sub> O, 60 °C) das xilanas da madeira <i>Paulownia elongata</i> / <i>Paulownia fortunei</i> .....	<b>74</b>
<b>Figura 3.5.</b> Cromatograma LEX/SEC, dos XOS obtidos por hidrólise parcial ácida, a partir das xilanas de madeira <i>Paulownia elongata</i> / <i>Paulownia fortunei</i> .....	<b>75</b>
<b>Figura 3.6.</b> Espectro de ESI-MS da fracção neutra F3 de: A) espectro completo, para <i>m/z</i> entre 400 e 1500; B) espectro ampliado da zona de <i>m/z</i> entre 515 e 625.....	<b>77</b>
<b>Figura 3.7.</b> Espectro de MALDI-MS da fracção neutra F3.....	<b>78</b>
<b>Figura 3.8.</b> Espectro de ESI-MS da fracção ácida F2.....	<b>80</b>
<b>Figura 3.9.</b> Espectro de MALDI-MS da fracção ácida F2.....	<b>81</b>
<b>Figura 3.10.</b> Espectro de ESI-MS/MS do ião de <i>m/z</i> 479 obtido num ESI-Q-TOF.....	<b>85</b>
<b>Figura 3.11.</b> Espectro de ESI-MS/MS do ião de <i>m/z</i> 653 obtido num ESI-Q-TOF.....	<b>86</b>
<b>Figura 3.12.</b> Espectro de ESI-MS/MS do ião de <i>m/z</i> 933 obtido num ESI-Q-TOF.....	<b>88</b>

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 2.1.</b> Resumo dos iões de valores de $m/z$ correspondentes aos oligossacarídeos identificados nos espectros de ESI-MS, sob a forma de $[M+Na]^+$ , para a gelana comercial e para a gelana modificada- JB3.....	<b>34</b>
<b>Tabela 2.2.</b> Correspondência entre os iões encontrados nas fracções de gelana comercial e de gelana modificada.....	<b>53</b>
<b>Tabela 3.1.</b> Composição em açúcares das amostras de xilanas de <i>Paulownia elongata</i> <i>Paulownia fortunei</i> .....	<b>71</b>
<b>Tabela 3.2.</b> Abundâncias relativas dos diferentes fragmentos presentes nas unidades estruturais das xilanas de <i>Paulownia elongata</i> / <i>Paulownia fortunei</i> .....	<b>73</b>
<b>Tabela 3.3.</b> Desvios químicos de próton ( $\delta$ , ppm), observados no espectro TOCSY, relativos aos fragmentos das xilanas de <i>Paulownia elongata</i> / <i>Paulownia fortunei</i> .....	<b>74</b>
<b>Tabela 3.4.</b> Xilo-oligossacarídeos neutros identificados nos espectros de ESI-MS e MALDI-MS.....	<b>79</b>
<b>Tabela 3.5.</b> Xilo-oligossacarídeos ácidos identificados nos espectros de ESI-MS e MALDI-MS, os quais apresentam na sua constituição um resíduo de MeGlcA.....	<b>82</b>
<b>Tabela 3.6.</b> Xilo-oligossacarídeos ácidos identificados nos espectros de MALDI-MS, os quais apresentam na sua constituição dois resíduos de MeGlcA. ....	<b>83</b>
<b>Tabela 3.7.</b> Xilo-oligossacarídeos ácidos identificados nos espectros de MALDI-MS, os quais apresentam na sua constituição um resíduo de MeGlcA e um resíduo de GlcA.....	<b>84</b>

## ABREVIATURAS

**Ac** – acetato

**APCI** – ionização química à pressão atmosférica

**Ara** – arabinose

**CI** – ionização química

**CID** – dissociação induzida por colisão

**CMBT** – 5-cloro-mercaptop-benzotiazole

**Da** – dalton

**DC** – corrente continua

**DHB** – ácido 2,5-dihidroxibenzóico

**DMSO** – dimetilssulfóxido

**DP** – grau de polimerização

**EPS** – polissacarídeos extracelulares

**EI** – ionização por impacto electrónico

**ELSD** – Evaporative light scattering detection

**ESI** – ionização por electrospray

**ESI-MS** – espectrometria de massa com ionização por electrospray

**ESI-MS/MS** – espectrometria de massa tandem com ionização por electrospray

**FAB** – bombardeamento com átomos rápidos

**FDA** – Food and Drug Administration

**FID** – detector de ionização de chama

**Gal** – galactose

**GalA** – ácido galacturónico

**GC-MS** – cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massa

**Glc** – glucose

**GlcA** – ácido glucurónico

**IT** – trapa de iões

**LEX-SEC** – cromatografia de afinidade / exclusão molecular

**MALDI** – ionização por desorção por laser assistida por matriz

**Man** – manose

**MeGlcA** – ácido 4-*O*-metil glucurónico

**MS** – espectrometria de massa

**MS/MS** – espectrometria de massa tandem

***m/z*** – razão massa/carga

**OAc** – acetato

**OGI** – glicerato

**Q** – analisador de quadrupolo

**RF** – rádio frequência

**Rha** – ramnose

**RMN** – Ressonância magnética

nuclear

**RMN de  $^{13}\text{C}$**  – Ressonância

magnética nuclear de carbono

**RMN de  $^1\text{H}$**  – Ressonância

magnética nuclear de próton

**rpm** – rotações por minuto

**TFA** – ácido trifluoroacético

**TOF** – analisador de tempo-de-voo

**TSP** – ionização por termospray

**XOS** – xilo-oligossacarídeos

**Xyl** – xilose

**$\delta$**  - desvio químico (em ppm)





## **CAPÍTULO 1**

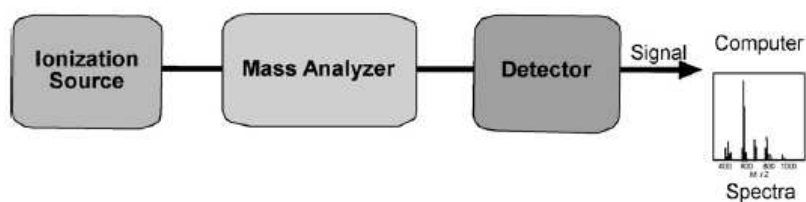
# **INTRODUÇÃO**



## 1.1. ESPECTROMETRIA DE MASSA

A Espectrometria de Massa começou a ser desenvolvida no início do século XX, através do trabalho desenvolvido por JJ Thomson e seus colaboradores, no Laboratório Cavendish, em Cambridge (Lindon *et al.*, 2000). Nos últimos tempos, a espectrometria de massa tem vindo a ser uma técnica essencial, com potenciais aplicações em numerosos estudos químicos e biológicos (Sleno *et al.*, 2004), sendo hoje em dia um dos métodos mais sensíveis para a caracterização estrutural de biomoléculas (Griffiths *et al.*, 2001). É de salientar o seu papel importante na análise de proteínas, para a qual é a técnica de eleição.

Um espectrómetro de massa é constituído por três componentes básicos: a fonte de ionização, o analisador e o detector (Figura 1.1). A utilização de espectrómetros de massa proporciona informação relativa ao peso molecular dos compostos em análise. Para tal, a amostra é introduzida na fonte de ionização do instrumento, onde as moléculas da amostra são ionizadas (porque os iões são mais facilmente manipuláveis do que as espécies neutras) e estes iões são então conduzidos para o espectrómetro de massa (analisador) onde são posteriormente separados segundo a sua razão massa/carga ( $m/z$ ) (Ashcroft, 1997; Johnstone *et al.*, 1996). Os iões separados são detectados e a sua abundância relativa é registada, o que conduz à formação do espectro de massa que é registado por um computador (Lindon *et al.*, 2000), obtendo-se assim um espectro de varrimento de massa.



**Figura 1.1.** Componentes principais que fazem parte de um espectrómetro de massa, que consiste numa fonte de ionização, seguida de um analisador de massa e um detector. É ainda utilizado um computador para gerar os espectros de massa a partir dos sinais emitidos pelo detector (Kicman *et al.*, 2007).

Os primeiros espectrómetros de massa apenas eram capazes de efectuar espectros de varrimento de massa e a elucidação da estrutura era baseada na dissociação do ião molecular, dissociação esta que ocorria no interior da fonte de ionização. Estes

instrumentos eram muito úteis, mas apenas para uma gama restrita de compostos de baixo peso molecular e compostos voláteis e, não era adequada para a análise de misturas. Mais tarde, de modo a permitir a análise de compostos não voláteis, de maior peso molecular e a análise de misturas, surgiram as técnicas de ionização suave tais como bombardeamento por átomos rápidos (FAB), ionização por electrospray (ESI) e ionização por desorção por laser assistida por matriz (MALDI), as quais alargaram a área de aplicação da espectrometria de massa à análise de compostos polares e termicamente lábeis (Sleno *et al.*, 2004). No entanto, sendo estas técnicas de ionização suave, promoviam a formação de espécies protonadas ou desprotonadas sem que ocorresse qualquer tipo de fragmentação na fonte; tal facto limitava a caracterização estrutural dos compostos a partir de análises por MS. Desta forma surgiu a espectrometria de massa tandem, como uma técnica essencial para a análise estrutural de uma grande variedade de compostos biológicos relevantes, tais como fármacos, péptidos e proteínas e ácidos nucleicos, entre outros (Sleno *et al.*, 2004).

## 1.2. MÉTODOS DE IONIZAÇÃO

Existem vários métodos de ionização, tendo cada um deles as suas vantagens e desvantagens associadas. O método de ionização a utilizar depende do tipo de amostra, do tipo de espectrómetro de massa que se vai utilizar e do equipamento disponível (Ashcroft, 1997). O método de ionização utilizado para efectuar a análise de uma determinada substância influencia substancialmente o aspecto final do respectivo espectro de massa.

Existem uma série de métodos de ionização, tais como ionização por impacto electrónico (EI), ionização química (CI), bombardeamento por átomos rápidos (FAB), termospray (TSP), ionização por electrospray (ESI), ionização química à pressão atmosférica (APCI) e ionização por desorção por laser assistida por matriz (MALDI) (Ashcroft, 1997; Ardrey, 2003).

Até aos anos 80, as biomoléculas eram geralmente ionizadas por impacto electrónico (EI) ou por ionização química (CI). No entanto, para que possa ocorrer ionização através de um destes dois métodos, uma condição é exigida, as amostras tem que ser voláteis. Tal facto não é preocupante quando se está a falar da análise de pequenas moléculas orgânicas,

ou amostras que possam ser analisadas por GC-MS (cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massa). Contudo, amostras polares, não voláteis ou termicamente lábeis não podem ser analisadas por EI-MS ou CI-MS sem que haja uma derivatização prévia (Chapman, 1993; Griffiths *et al.*, 2001). Tal facto limitava um pouco a sua utilização. Posteriormente, com o desenvolvimento das técnicas de ionização por desorção, surgiram novas fontes de ionização, nomeadamente a ionização por bombardeamento por átomos rápidos (FAB) e a ionização por laser (MALDI), as quais vieram permitir a análise de amostras polares e não voláteis por espectrometria de massa (Brüll *et al.*, 1998).

Hoje em dia, a ionização por desorção por laser assistida por matriz (MALDI) assim como a ionização por electrospray (ESI), são os métodos de ionização mais importantes e os mais utilizados para a análise de compostos não voláteis e compostos de elevado peso molecular (Zenobi *et al.*, 1998).

Uma vez que, para o desenvolvimento deste trabalho prático foram utilizadas essencialmente as fontes de ESI e MALDI, de seguida será efectuada uma breve referência a estes dois tipos de métodos de ionização.

### **1.2.1. Ionização por Electrospray (ESI)**

A primeira utilização de um espectrómetro de massa combinado com uma fonte de ionização de electrospray foi publicada em 1984 (Griffiths *et al.*, 2001) e, desde então que esta técnica tem vindo a ser empregue na análise de uma série de compostos polares com massas moleculares entre os 100 e 200 000 Da (Ashcroft, 1997). Uma característica importante da ESI é o facto de que, para determinados compostos de peso molecular elevado (muito superior a 1000 Da), os iões que se formam são multicarregados. Enquanto que pequenas moléculas orgânicas têm tendência a aparecer como moléculas monoprotonadas (ou monodesprotonadas) no espectro de ESI, moléculas grandes com várias zonas básicas (ou ácidas) têm tendência a originar moléculas multiprotonadas (ou multidesprotonadas) (Chapman, 1993; Griffiths *et al.*, 2001). Esta característica da ESI é extremamente vantajosa na análise de moléculas de elevado peso molecular, uma vez que estando os iões multicarregados, o seu valor de  $m/z$  será suficientemente baixo para que estes possam ser detectáveis mesmo operando com espectrómetros de massa com limites

de detecção de  $m/z$  baixos (Ardrey, 2003; Skoog *et al.*, 1998). As classes de compostos que são analisados por electrospray de uma forma rotineira incluem as proteínas e os péptidos, açúcares, drogas e seus metabolitos, fosfolípidos. De uma forma geral, a maioria dos compostos orgânicos podem ser analisados por electrospray (Ashcroft, 1997; Cech *et al.*, 2001).

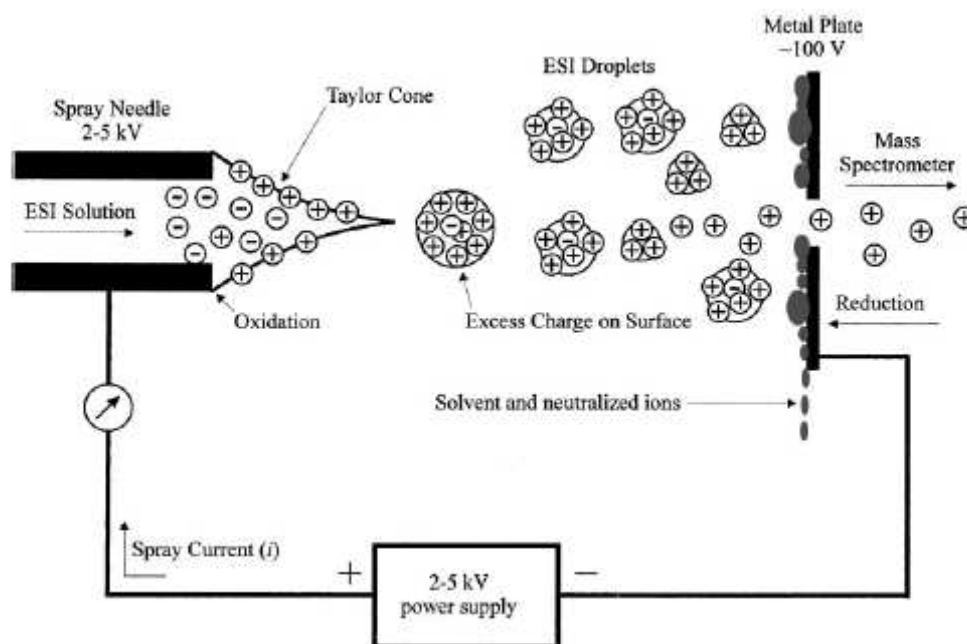
A ionização por electrospray é uma técnica de ionização que opera à pressão atmosférica e, pode ser acoplada a analisadores do tipo sector magnético, quadrupolo e de tempo de voo (Ashcroft, 1997). Esta técnica de ionização consiste em dois processos básicos:

- i) formação de um spray de gotas carregadas a partir da solução que contém o analito;
- ii) vaporização do solvente, de forma a originar iões na fase gasosa (Johnstone *et al.*, 1996).

Em ESI a amostra em solução é introduzida num capilar, a um fluxo que pode variar entre 1  $\mu\text{L}/\text{min}$  e 1  $\text{mL}/\text{min}$ , mas geralmente o fluxo encontra-se numa gama entre 5-300  $\mu\text{L}/\text{min}$  (Ashcroft, 1997). Sob o capilar é aplicada uma voltagem elevada (2-5 kV). Esta voltagem pode ser negativa ou positiva, consoante o tipo de análise escolhida (ESI em modo positivo, ou em modo negativo respectivamente) (Ardrey, 2003). A voltagem aplicada gera um gradiente de campo eléctrico necessário para produzir a separação das cargas à superfície do líquido. Como resultado, o líquido projecta-se para fora da extremidade do capilar, a qual é designada por *Cone de Taylor* (Figura 1.2) (Cech *et al.*, 2001). A elevada voltagem aplicada, combinada com um fluxo coaxial de um gás nebulizador (azoto –  $\text{N}_2$ ), provocam a formação de um spray com gotas carregadas (positiva ou negativamente, consoante a análise é efectuada em modo positivo ou negativo, respectivamente) (Cech *et al.*, 2001; Ardrey, 2003). A utilização do gás nebulizador, o azoto ( $\text{N}_2$ ), faz com que o solvente seja evaporado, facilitando a formação dos iões na fase gasosa (Ardrey, 2003). Desta forma, o processo ESI origina iões na fase gasosa, os quais já podem ser analisados no espectrómetro de massa através da sua razão massa/carga ( $m/z$ ) (Cech *et al.*, 2001).

A escolha do solvente para efectuar análises por ESI é muito importante, pois este apresenta uma elevada contribuição para a formação de um spray estável durante a fase de ionização, bem como para a evaporação posterior do solvente aquando da formação dos

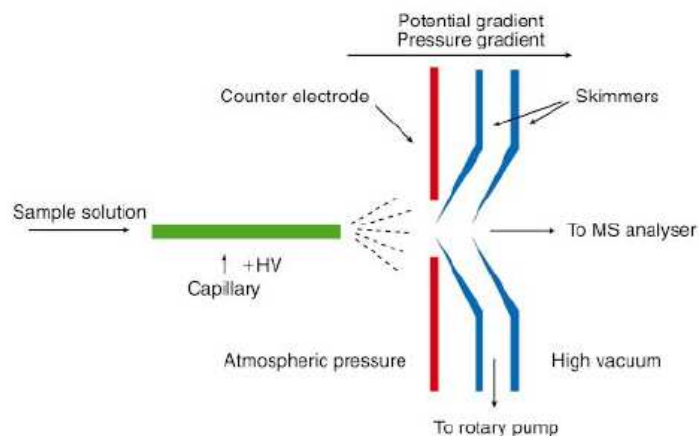
iões. Quando se pretende operar em modo positivo, geralmente utilizam-se soluções aquosas contendo aproximadamente 50% de um solvente orgânico ligeiramente polar (metanol ou acetonitrilo, por exemplo) (Cech *et al.*, 2001). No entanto, quando se está a trabalhar com amostras solúveis em solventes orgânicos, a solução que por norma se utiliza é uma mistura de clorofórmio ( $\text{CHCl}_3$ ) e metanol.



**Figura 1.2.** Esquema ilustrativo do processo de ionização por electrospray operando em modo positivo (Cech *et al.*, 2001).

A passagem dos iões formados na fonte de ionização (que se encontra à pressão atmosférica), para o analisador de massa (que se encontra sob alto vácuo), é efectuada por bombeamento diferencial, através de uma série de câmaras com gradiente de pressão e gradiente de potencial (Figura 1.3). O gradiente de potencial aplicado sobre as lentes é que vai direccionar o feixe de iões para o analisador (Ashcroft, 1997; Cech *et al.*, 2001).





**Figura 1.3.** Representação esquemática de uma fonte de ionização de electrospray (Griffiths *et al.*, 2001).

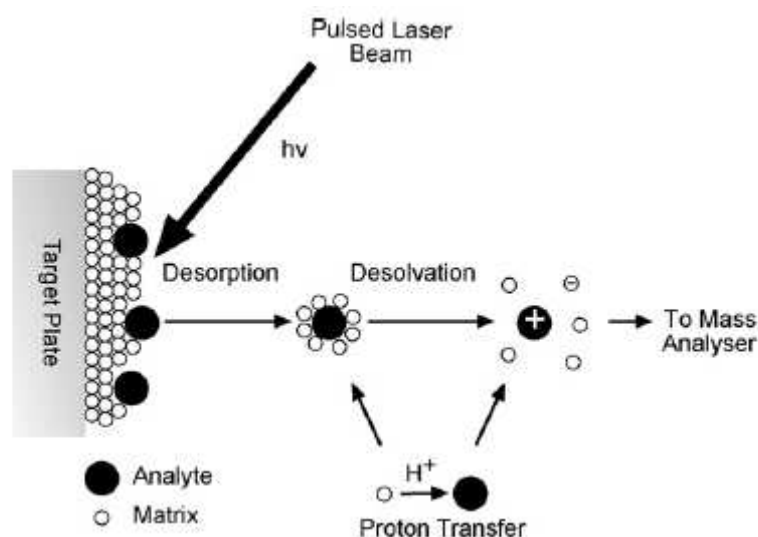
A utilização da espectrometria de massa com ionização por electrospray é uma técnica mais rápida, sensível e precisa para a determinação da massa de moléculas biológicas do que as técnicas tradicionais, como por exemplo da electroforese capilar (Cech *et al.*, 2001).

### 1.2.2. Ionização por desorção por laser assistida por matriz (MALDI)

A ionização por desorção por laser assistida por matriz (MALDI) foi introduzida por Koichi Tanaka e por Franz Hillenkamp, no final dos anos oitenta (Karas *et al.*, 1988). O MALDI é vastamente utilizado para a análise, por espectrometria de massa, de biomoléculas grandes e não voláteis, como é o caso dos péptidos, proteínas, oligonucleótidos e oligossacarídeos (Zenobi *et al.*, 1998). Geralmente a fonte de MALDI encontra-se associada a analisadores de massa de tempo de voo, devido à sua sensibilidade e velocidade de análise, mas também porque este tipo de analisador não tem (teoricamente) limite para detecção de massa (Ashcroft, 1997).

O princípio da ionização por MALDI está baseado na deposição de um analito não volátil disperso num excesso de matriz (material orgânico) em solvente orgânico ou aquoso. Alguns microlitros desta mistura são aplicados num suporte metálico (placa), ocorrendo posteriormente a evaporação do solvente. Esta evaporação vai originar a formação de uma camada de cristais de matriz/analito formados aleatoriamente. Depois de

formados os cristais, a placa é introduzida na fonte (região de alto vácuo) e é irradiada por um laser (geralmente de comprimento de onda de 337 nm), sendo esta irradiação efectuada por pulsos. A matriz tem que ser capaz de absorver a energia na região do comprimento de onda do laser. A matriz, que se encontra presente em maior concentração que o analito, absorve a maior parte da energia sob a forma de calor, o que significa que o analito permanece intacto. Forma-se então uma densa nuvem de partículas, por sublimação da matriz e uma rápida expansão da matriz e do analito para a fase gasosa. A ionização ocorre por transferência de prótons entre a matriz foto-excitada e o analito (Kicman *et al.*, 2007). Na figura 1.4 encontra-se representado de forma esquemática o processo de ionização por MALDI.



**Figura 1.4.** Ionização do analito por MALDI. O cristal formado pela matriz e o analito é irradiado por um laser, o qual provoca o processo de desorção seguido de dessolvatação. Os íões então formados são direccionados por acção de uma diferença de potencial para o analisador (Kicman *et al.*, 2007).

A escolha da matriz é crucial para a obtenção de bons resultados quando se efectuam análises por MALDI. Derivados de ácido benzóico, ácido cinâmico e outros compostos aromáticos relacionados, foram reconhecidos como sendo boas matrizes para a análise de proteína por MALDI (Zenobi *et al.*, 1998; Harvey, 2006). Relativamente à análise de oligossacarídeos, a matriz que tem vindo a ser mais utilizada é a DHB (Ácido 2,5-Dihidroxibenzóico) (Harvey, 2006).

### 1.3. ANALISADORES

Depois de produzidos os iões através do método de ionização adequado, torna-se necessário separar os iões de diferentes razões  $m/z$ , determinar o valor de  $m/z$  e posteriormente medir as intensidades relativas dos diferentes grupos de iões (Lindon *et al.*, 2000). Existe uma série de analisadores que podem ser utilizados em espectrometria de massa: sector magnético, sector eléctrico, quadrupolo (Q), tempo de voo (TOF), trapa de iões (IT) e analisador de transformada de Fourier. Neste trabalho apenas serão abordados os analisadores do tipo quadrupolo, os analisadores de tempo de voo e os analisadores de trapa de iões, pois foram estes os analisadores presentes nos espectrómetros de massa utilizados para a realização do trabalho apresentado.

#### 1.3.1. Quadrupolo (Q)

Um analisador do tipo quadrupolo (Q) consiste em quatro tubos metálicos cilíndricos dispostos paralelamente, tal que o campo eléctrico que existe entre eles é hiperbólico. O feixe de iões é focado ao longo do eixo deste arranjo quadrático, através da aplicação de uma corrente contínua (DC), e de uma rádio frequência (RF), a cada par de pólos opostos (Figura 1.5) (Kicman *et al.*, 2007). Os iões são impulsioneados a partir da fonte para o analisador de quadrupolo através da aplicação de uma pequena voltagem de aceleração (entre 5 – 15 V) e, sob a influência de uma combinação de DC e do campo oscilatório RF, os iões seguem e atravessam o analisador (Watson, 1985).

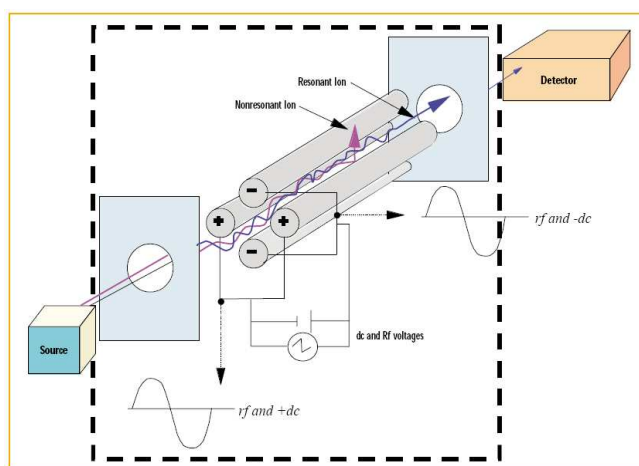
Uma vez que os iões se deslocam em direcção ao detector segundo o eixo dos Z, o seu movimento ao longo do plano X-Y é descrito pela equação de Mathieu, a qual define os parâmetros  $a$  e  $q$  como:

$$a_x = -a_y = 4zeU / m\omega^2 r_0^2 \quad (\text{Equação 1})$$

$$q_x = -q_y = 2zeV / m\omega^2 r_0^2 \quad (\text{Equação 2})$$

onde,  $z$  é carga do ião;  $e$  é a carga do electrão;  $r_0$  é a meia distância entre tubos cilíndricos opostos do quadrupolo;  $m$  é a massa do ião;  $\omega$  é a frequência angular (RF);  $U$  é a voltagem de corrente directa DC;  $V$  é a amplitude do campo RF.

Os parâmetros  $a$  e  $q$  definem o diagrama de estabilidade, o qual apresenta regiões de coordenadas  $(a, q)$  nas quais os iões apresentam trajectórias matematicamente estáveis, no campo de quadrupolo (Watson, 1985). Se a oscilação dos iões no quadrupolo tiver uma amplitude finita, a sua trajectória é considerada como estável e os iões são encaminhados para o detector. Se, pelo contrário, a sua trajectória não é estável, a amplitude torna-se infinita e os iões oscilam descontroladamente. Neste caso, os iões colidem com os tubos metálicos e como tal não vão alcançar o detector (Johnstone *et al.*, 1996).



**Figura 1.5.** Esquema representativo de um analisador do tipo quadrupólo (<http://www.waters.com>).

O analisador do tipo quadrupolo é um aparelho de pequenas dimensões (compacto), não é muito caro e é mais robusto do que os outros tipos de espectrómetros de massa. Apresenta ainda uma outra vantagem, que está relacionada com o elevado número de scans que pode efectuar, como tal, um espectro de massa completo pode ser obtido em menos de 100 ms (Skoog *et al.*, 1998). Apesar deste tipo de analisador não apresentar elevada resolução para uma vasta gama de valores de  $m/z$  (para  $m/z$  até 3000-4000), este facto pode ser contornado através da utilização de técnicas de ionização, tais como o electrospray, as quais promovem a formação de iões multicarregados (Chapman, 1993; Skoog *et al.*, 1998).

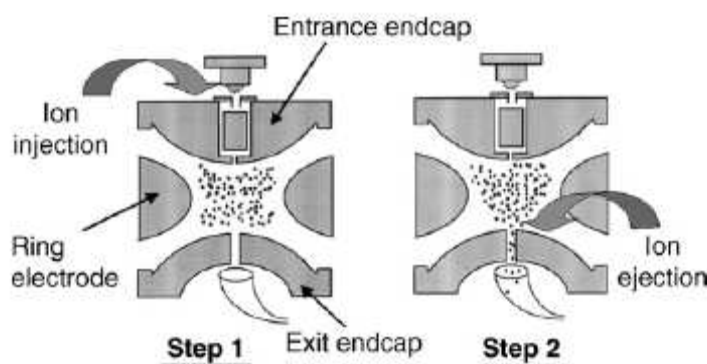
### 1.3.2. Trapa de iões (IT)

Os analisadores de trapa de iões consistem num quadrupolo tridimensional (Ardrey, 2003). A base do seu funcionamento está na captura dos iões numa caixa, por aplicação de um campo eléctrico e consequente ejeção selectiva dos iões de acordo com a sua razão  $m/z$  (Johnstone *et al.*, 1996).

Este analisador consiste num arranjo tridimensional de três eléctrodos; eléctrodo de anel em forma hiperbólica, o qual se situa entre outros dois eléctrodos, os eléctrodos de tampa (Figura 1.6) (Fernández, 2007). A geometria deste aparelho é dada pela seguinte equação:

$$r_0^2 = 2z_0^2 \quad (\text{Equação 3})$$

onde  $r_0$  é o raio do eléctrodo de anel, o qual apresenta um valor geralmente próximo de 1 cm (Chapman, 1993), e  $z_0$  é a distância entre os eléctrodos de tampa (March, 1997).



**Figura 1.6.** Representação esquemática de um analisador do tipo trapa de iões (Kicman *et al.*, 2007).

Aos eléctrodos de tampa é aplicada uma voltagem de corrente contínua  $U$ , enquanto que ao eléctrodo de anel é aplicada uma voltagem de rádio frequência  $V$  (Chapman, 1993). Desta forma, em contraste com o que acontece no quadrupolo, os iões, após serem introduzidos na trapa de iões, são sujeitos a um campo eléctrico oscilatório e mantêm trajetórias estáveis, permanecendo assim dentro da trapa. Por variação dos potenciais aplicados, iões com uma determinada razão  $m/z$  tornam-se assim instáveis e são ejectados

em direcção ao detector. Fazendo variar a voltagem RF de uma forma sistemática, é possível obter o espectro de massa (March, 1997; Ardrey, 2003). A estabilidade ou a instabilidade do movimento adquirido pelos iões é determinada pelos parâmetros  $a$  e  $q$ , os quais são análogos aos descritos para o analisador de quadrupolo nas equações 1 e 2 (Johnstone *et al.*, 1996). Quando se opera em modo RF, isto é, mantendo a voltagem DC ( $U$ ) constante, o parâmetro  $a$  é igualado a zero sendo então a estabilidade dos iões apenas dada em função do parâmetro  $q$ :

$$q = (z/m) 2eV / \omega^2 r_0^2 \quad \text{(Equação 4)}$$

Como tal, o espectro de massa é obtido por varrimento de valores de RF crescentes ( $V$ ), em que os iões de valores de  $m/z$  sucessivamente maiores atingem o limite de estabilidade e são ejetados para o detector (Watson, 1985; March, 1997; Ardrey, 2003).

As principais vantagens da utilização de uma trapa de iões para análises químicas são as seguintes:

- i) elevada sensibilidade;
- ii) equipamento compacto e com uma mecânica simples;
- iii) possibilidade de efectuar análises por espectrometria de massa tandem, de forma a obter análises de sequenciação;
- iv) elevada resolução ( $> 10^6$  para razões  $m/z > 1000$ )

### **1.3.3. Analisador de tempo de voo (TOF)**

O analisador de tempo de voo (TOF) está geralmente associado a métodos de ionização por MALDI (Ashcroft, 1997).

O princípio básico de um analisador de tempo de voo envolve a medição do tempo que um ião demora a percorrer o tubo de voo, desde a fonte de ionização até que atinge o detector. Este processo requer a formação de um grupo de iões na fonte de ionização, que posteriormente são acelerados até atingirem o detector. Teoricamente, todos os iões recebem a mesma energia cinética durante o período de aceleração, mas uma vez que os

iões apresentam massas diferentes, estes separam-se em grupos de acordo com a sua velocidade enquanto atravessam o tubo de voo, que consiste numa região livre de campo, situada entre a fonte de ionização e o detector (Figura 1.7) (Watson, 1985). Desde que:

$$zeV = mv^2 / 2 \quad \text{(Equação 5)}$$

Então a velocidade ( $v$ ) de um ião ( $m$ ) é dada por:

$$v = (2zeV / m)^{1/2} \quad \text{(Equação 6)}$$

Deste modo, a velocidade de um ião é dependente da massa do mesmo e, se um grupo de iões ( $m_1, m_2, m_3, \dots, m_n$ ) forem acelerados e posteriormente direccionados para atravessar uma região livre de campo, os iões irão atingir o detector a intervalos de tempo diferentes, dependendo das suas velocidades ( $v_1, v_2, v_3, \dots, v_n$ ).

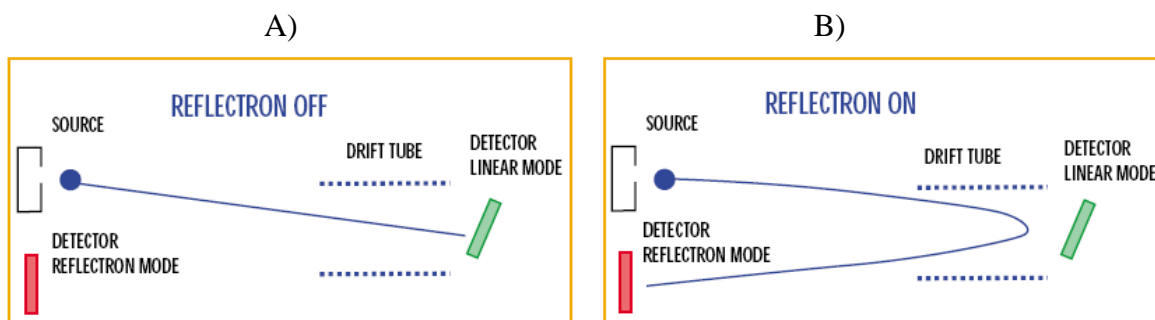
Se a região livre de campo apresentar um comprimento  $l$ , então, para uma dada velocidade  $v$ :

$$t = l / v \quad \text{(Equação 7)}$$

Então, substituindo a velocidade pela equação 6, temos que:

$$t = (m/z)^{1/2} l / (2eV)^{1/2} \quad \text{ou} \quad (m/z) = 2eV (t / l)^2 \quad \text{(Equação 8)}$$

Como tal, o tempo,  $t$ , que um ião leva a atingir o detector é directamente proporcional à raiz quadrada do seu valor de  $m/z$ . Sendo assim, quanto maior for a massa de um ião monocarregado, maior será o tempo que este demorará a atravessar a região livre de campo (Johnstone *et al.*, 1996).



**Figura 1.7.** Representação esquemática de um analisador de tempo de voo: A) operando em modo linear; B) operando em modo reflectrão (<http://www.waters.com>).

Os analisadores de tempo de voo podem operar de duas formas distintas: em modo linear e em modo reflectrão. Os que operam em *modo linear* são de geometria mais simples; no entanto, o seu poder de resolução é baixo. Tal facto verifica-se porque iões com a mesma massa poderão apresentar ligeiras diferenças de energia cinética e como tal apresentarão variações nas suas velocidades, pelo que iões do mesmo valor de  $m/z$  atingem o detector a tempos ligeiramente diferentes. Estes efeitos contribuem para a ocorrência de variações nos sinais resultantes, o que vai provocar uma diminuição do poder de resolução deste tipo de analisador. Para combater estes efeitos, foi desenvolvido o *reflectrão*, o que garante que iões da mesma massa atingem o detector ao mesmo tempo, e como tal aumenta o poder de resolução do aparelho. O reflectrão colocado no final do tubo de voo consiste numa série de anéis ou de redes de voltagem crescentes até um máximo, ligeiramente superior ao valor da voltagem de aceleração. Os iões penetram no reflectrão até atingir uma energia nula e os iões com maior energia penetram mais profundamente no reflectrão, pelo que descrevem uma trajectória maior que os iões de menor energia e são reacelerados, saindo do reflectrão com uma energia idêntica, mas no sentido inverso, atingindo o colector ao mesmo tempo (Johnstone *et al.*, 1996).

Uma vantagem da utilização de analisadores TOF é o seu rápido tempo de resposta e, como tal, ele é geralmente utilizado associado a instrumentos que promovam a formação de iões por pulsos, como por exemplo, associado a MALDI (Johnstone *et al.*, 1996). Uma outra vantagem deste tipo de analisador é que, teoricamente, não apresentam limite de massa analisável e apresentam uma elevada resolução. Por esta razão, esta técnica tem



vindo a ser utilizada na análise de materiais poliméricos de elevado peso molecular, tanto de origem biomolecular, em especial as proteínas, como de origem sintética (Ashcroft, 1997; Johnstone *et al.*, 1996; Kicman *et al.*, 2007; Wysocki *et al.*, 2005; Barnes *et al.*, 2007; Chernushevich *et al.*, 2001).

#### 1.4. ESPECTROMETRIA DE MASSA TANDEM

O aparecimento de técnicas de ionização suaves, tais como FAB, ESI e MALDI contribuiu para o alargamento do campo de aplicação da espectrometria de massa, uma vez que trouxe a possibilidade de analisar compostos polares, não voláteis e termicamente lábeis. No entanto, uma vez que estas técnicas de ionização não provocam qualquer tipo de fragmentação do ião precursor na fonte, os espectros de varrimento obtidos por ionização por FAB, ESI e MALDI apenas mostram os iões moleculares dos compostos presentes na amostra, permitindo assim obter apenas informação sobre os correspondentes pesos moleculares. Esta característica é uma vantagem porque permite a análise de misturas. No entanto, não é possível obter mais informação estrutural, pelo que surgiu então a *Espectrometria de Massa Tandem ou MS/MS* como uma técnica essencial para a análise estrutural de uma variada gama de compostos biológicos relevantes (Sleno *et al.*, 2004; Finehout *et al.*, 2004).

A espectrometria de massa tandem surge como sendo uma técnica muito importante, em que dois ou mais analisadores de massa são acoplados, com o intuito de efectuar uma análise estrutural detalhada (Ashcroft, 1997; Johnstone *et al.*, 1996; Skoog *et al.*, 1998). Em análises por MS/MS, o ião precursor é seleccionado no primeiro analisador, activado na célula de colisões por colisão com um gás (onde vai ser fragmentado) e passa posteriormente para o segundo analisador (Skoog *et al.*, 1998; Griffiths *et al.*, 2001). Um gás inerte é geralmente introduzido na célula de colisões, provocando a colisão entre o ião precursor e os átomos de gás inerte. Nestas colisões, parte da energia translacional do ião precursor pode ser convertida em energia interna, provocando um estado de excitação nos iões. Os iões precursores excitados são então decompostos em fragmentos por um processo denominado *Dissociação Induzida por Colisão (CID)* (Griffiths *et al.*, 2001).

A utilização da espectrometria de massa tandem fornece informação mais específica acerca da estrutura da amostra, através da análise dos iões fragmento formados a partir do ião precursor seleccionado no primeiro analisador. Como tal, a MS/MS é utilizada para a elucidação estrutural de amostras desconhecidas, ou para detecção de um composto conhecido numa matriz complexa (Ashcroft, 1997).

Os primeiros ensaios por MS/MS foram efectuados em instrumentos multi-sector (sector eléctrico, sector magnético) e em instrumentos híbridos, por exemplo BE, EB, BEEB, EBQ (B = sector magnético; E = sector eléctrico e Q = quadrupolo) (Griffiths *et al.*, 2001).

Hoje em dia, as aplicações da espectrometria de massa tandem são desenvolvidas essencialmente em três tipos de equipamentos:

- Analisadores híbridos Q-TOF;
- Analisadores híbridos TOF-TOF;
- Analisadores de trapa de iões.

Nestes últimos (analisadores de trapa de iões), verifica-se apenas a presença de um tipo de analisador, o analisador de *trapa de iões*, o qual tem, por si só, a capacidade de reter os iões seleccionados na trapa, fazê-los colidir com um gás para provocar a sua dissociação e posteriormente proceder à sua detecção. Ou seja, o isolamento dos iões de interesse e a sua subsequente dissociação são analisados na mesma câmara. Curiosamente, qualquer um dos iões fragmento pode ser mantido na trapa e pode ser aplicado novamente o processo de colisão para provocar a dissociação deste novo ião precursor. Esta análise deverá ser denominada por MS/MS/MS (ou MS<sup>3</sup>). Os iões fragmento obtidos podem ser sequencialmente fragmentados e então obter espectros de MS<sup>n</sup> que permitem obter informação sobre a sequência do fragmento (Johnstone *et al.*, 1996).

## **1.5. UTILIZAÇÃO DA ESPECTROMETRIA DE MASSA PARA A ANÁLISE DE AÇÚCARES**

Até ao início dos anos 90, a análise de oligossacarídeos, através de técnicas de espectrometria de massa, estava limitada à utilização de métodos de ionização por impacto

electrónico, ionização química e ionização por bombardeamento por átomos rápidos (FAB) (Reinhold, 1987). O desenvolvimento de métodos de ionização, tais como MALDI e ESI, permitiu a aplicação da espectrometria de massa para a caracterização estrutural de oligossacarídeos de maior grau de polimerização (DP) e com diversas composições (Reinhold *et al.*, 1995; Reinhold *et al.*, 1996). A grande vantagem da utilização da espectrometria de massa para a análise de polissacarídeos está relacionada com a sua elevada sensibilidade, versatilidade analítica, elevada capacidade para analisar misturas e acima de tudo, precisão (Fernadéz, 2007; Zaia, 2004). Informação relativa à caracterização estrutural de polissacarídeos, tal como i) identificação das unidades de monossacarídeos; ii) determinação da sequência dos monossacarídeos; iii) determinação do tipo de ligação (Bahr *et al.*, 1997; Harvey, 2000; Gur'janov *et al.*, 2007); iv) determinação da configuração anomérica (Xue *et al.*, 2004) e, v) informação quanto ao padrão de ramificação (Harvey, 1997; Sheeley *et al.*, 1998), pode ser obtida por espectrometria de massa tandem.

A aplicação de técnicas de espectrometria de massa tem vindo a ser cada vez mais utilizada para a caracterização estrutural de polímeros, em complemento e alternativa às técnicas de espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN). Isto deve-se essencialmente ao facto de a espectrometria de massa ser uma técnica mais sensível, versátil e rápida, o que se torna vantajoso em relação por exemplo ao RMN, que por sua vez é uma técnica que implica a utilização de uma grande quantidade (0.5 – 1 mg) de amostra pura (Daas *et al.*, 1998).

A complexidade das amostras por vezes torna a sua caracterização por espectrometria de massa muito difícil, o que se traduz na necessidade de combinar a MS com outras técnicas complementares. Uma das formas de contornar este problema é a combinação da espectrometria de massa com técnicas de separação, tais como a cromatografia de exclusão molecular (SEC) (Reis *et al.*, 2002; Reis *et al.*, 2005; Jacobs, *et al.*, 2001b; Jacobs, *et al.*, 2002; Deery *et al.*, 2001; Zaia *et al.*, 2001), cromatografia de troca iónica de alta performance (HPAEC) (Kabel *et al.*, 2002; Lee, 1996; Mazumder *et al.*, 2005) bem como a cromatografia líquida em fase reversa de alta performance (RP-HPLC) (Kabel *et al.*, 2003). Através da aplicação destas técnicas cromatográficas, previamente à análise por MS, é possível efectuar uma separação da amostra em várias fracções, as quais já podem ser mais facilmente analisadas por espectrometria de massa. Para efectuar a análise de

polissacarídeos, a preparação da amostra requer uma hidrólise prévia (hidrólise ácida parcial ou hidrólise enzimática) para que ocorra a quebra do polissacarídeo inicial em oligossacarídeos de menor DP. No caso da utilização da SEC combinada com métodos de MS, os oligossacarídeos obtidos após hidrólise são separados segundo o seu peso molecular e, consequentemente, segundo o seu grau de polimerização.

A utilização de MALDI-MS ou ESI-MS proporciona informação acerca do peso molecular de oligossacarídeos presentes nas amostras analisadas e, combinando esta informação com a composição em resíduos de açúcares, é possível propor uma série de estruturas possíveis para os oligossacarídeos em análise. Informação estrutural detalhada e confirmação da estrutura, podem ser obtidas através da análise por espectrometria de massa tandem (MS/MS e MS<sup>n</sup>), através da utilização por exemplo de equipamentos do tipo MALDI-TOF/TOF, ESI-Q-TOF ou trapa de iões (Zaia, 2004; Fernadéz, 2007). Esta metodologia tem ainda a vantagem de permitir a diferenciação de estruturas isoméricas, uma vez que oligossacarídeos com diferente composição em monossacarídeos ou diferente sequenciação apresentam diferentes espectros de fragmentação (Fernadéz, 2007; Kato *et al.*, 2004; Maslen *et al.*, 2007; Gonçalves *et al.*, 2005).

Instrumentos equipados com ESI ou MALDI têm vindo a ser utilizados (operando tanto em modo positivo como em modo negativo) para a determinação do peso molecular (Kabel *et al.*, 2001; Jacobs *et al.*, 2001a), bem como para a caracterização estrutural de oligossacarídeos e glicoproteínas. Existem vários estudos efectuados com base nestas técnicas para obtenção de informação estrutural da fracção glicosídica de glicoproteínas (Harvey, 2000; Chai *et al.*, 2002; Pfenninger *et al.*, 2002; Weiskopf *et al.*, 1998; Chai *et al.*, 2001; Weiskopf *et al.* 1998). Curiosamente, a maioria dos trabalhos publicados foca a identificação da fracção glicosídica de proteínas, sendo a análise de oligossacarídeos de outras fontes naturais muito menos extensa, apesar da grande quantidade de polissacarídeos existentes na natureza. De entre estes últimos, referimos a aplicação da espectrometria de massa na caracterização de oligossacarídeos de pectinas (Körner *et al.*, 1999) e carragenanas (Ekeberg *et al.*, 2001; Antonopoulos *et al.*, 2004), bem como a análise estrutural de xilo-oligossacarídeos (XOS) da madeira de *Eucalyptus globulus*, nomeadamente na identificação estrutural de XOS (neutros e ácidos) existentes em misturas por ESI-MS e ESI-MS/MS (Reis *et al.*, 2004; Reis *et al.*, 2005). XOS de outros

tipos de madeira foram também já caracterizados por ESI-MS e ESI-MS/MS (Samuelsen *et al.*, 1999), bem como por MALDI-TOF-MS (Fukuyama *et al.*, 2005; Reis *et al.*, 2002). A distribuição de ácidos urónicos em cadeias de xilanas de várias espécies de madeira (Jacobs *et al.*, 2001b) foi obtida por MALDI-MS, assim como também foram caracterizadas glucomananas acetiladas de faia e de bétula (Teleman *et al.*, 2003). Para além da identificação dos XOS, a caracterização estrutural de isómeros de arabinoxilanas foi também obtida por MALDI-TOF/TOF (Maslen *et al.*, 2007). A determinação da massa molar, do grau de polimerização, bem como a determinação do grau de substituição por grupos acetilo, de hemiceluloses, foi efectuado por Jacobs *et al.* (2003), por MALDI-TOF-MS.

Estudos recentes têm sido também efectuados na caracterização de galactomananas presentes no café (Nunes *et al.*, 2005; Nunes *et al.*, 2006).

Cada vez mais, a espectrometria de massa e a espectrometria de massa tandem têm vindo a ser utilizadas como ferramentas indispensáveis para a identificação e caracterização estrutural de oligossacarídeos presentes em misturas, por vezes até complexas.

## **1.6. ÂMBITO DO TRABALHO**

Os heteropolissacarídeos são constituintes importantes de diversos materiais naturais e cujas características estruturais, nomeadamente a composição em açúcares, sequência, tipo de ligação e ramificações, condicionam profusamente as suas propriedades.

Neste âmbito, o presente trabalho tem como objectivo a caracterização estrutural de dois heteropolissacarídeos distintos: gelanas (exopolissacarídeos bacterianos) e xilanas (um dos componentes principais da parede celular).

A identificação da estrutura detalhada de gelanas reveste-se de grande importância, pois pequenos detalhes da sua estrutura, nomeadamente a presença de grupos glicerato e/ou acetilo condicionam as suas propriedades reológicas, importantes para as suas

aplicações industriais, nomeadamente como agentes gelificantes (Gunning *et al.*, 1996; Chandraeskaran *et al.*, 1992). Até ao momento, apenas se conhecem trabalhos de caracterização estrutural destes EPS por análise de açúcares, análise por metilação e análise por RMN (Jay *et al.*, 1998; Fialho *et al.*, 1999). No entanto, estas técnicas são morosas, uma vez que a preparação da amostra implica a elaboração de vários procedimentos laboratoriais. A aplicação de técnicas de espectrometria de massa com métodos de ionização suaves, como é o caso de ESI e MALDI, são técnicas de análise mais rápidas que proporcionam informação estrutural significativa. Como tal, tornou-se objectivo deste estudo a identificação e caracterização estrutural de oligossacarídeos pertencentes a dois tipos de gelanas distintas: uma gelana comercial e uma gelana modificada, JB3.

*Paulownia elongata* / *Paupownia fortunei* é uma espécie de árvore de crescimento rápido cuja madeira tem aplicação em diversas áreas, tais como mobiliário, instrumentos musicais e contraplacados que começa a ser proposta para utilização no fabrico da pasta de papel (Curley, 1993; Kalaycioglu *et al.*, 2005; Oslon *et al.*, 1985; Jiménez *et al.*, 2005). O crescente interesse na madeira de *Paulownia* estimulou o estudo das estruturas dos seus constituintes principais, onde se destacam a celulose e as xilanas. No entanto, não existem estudos relativos à caracterização estrutural destes componentes. Desta forma, xilanas da madeira de *Paulownia elongata* / *Paulownia fortunei* foram extraídas e isoladas no âmbito deste trabalho e caracterizadas estruturalmente por RMN, análise de açúcares e ESI-MS, ESI-MS/MS e MALDI-MS.



## **CAPÍTULO 2**

# **CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE GELANAS POR ESPECTROMETRIA DE MASSA**





## 2.1. CONSIDERAÇÕES TEÓRICAS

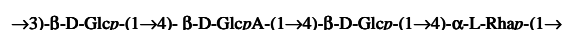
Muitas bactérias Gram-negativas apresentam a capacidade de sintetizar polissacarídeos extracelulares (EPS), os quais podem ter diversas funções biológicas, como por exemplo contribuir para a protecção celular contra agressões ambientais (Sá-Correia *et al.*, 2002). Muitos destes EPS tem ainda potencial aplicação em produtos biotecnológicos (Sá-Correia *et al.*, 2002) e aplicações ao nível da indústria alimentar e farmacêutica, entre outras (Crescenzi, 1995; Banik *et al.*, 2000). Em condições apropriadas, as gelanas, que são um tipo de EPS produzido pela espécie *Sphingomonas paucimobilis*, tem a capacidade de formar géis termorreversíveis e soluções aquosas altamente viscosas. Devido a estas suas propriedades, estes polissacarídeos apresentam inúmeras aplicações na indústria, como estabilizante e gelificante, assim como substituinte do agar na preparação de meios de cultura para células microbianas ou de plantas (Chandrasekaran *et al.*, 1995; Dlamini *et al.*, 1997; Giavasis, *et al.*, 2006). As gelanas e as xantanas são os únicos exopolissacarídeos bacterianos que têm aprovação por parte da *Food and Drug Administration* (FDA) para poderem ser utilizados como aditivos alimentares (Dlamini *et al.*, 1997; Banik *et al.*, 2000).

As gelanas foram descobertas nos finais dos anos 70, no entanto, a sua produção à escala laboratorial, a partir da espécie *Pseudomonas*, foi descrita pela primeira vez por Kang *et al.* em 1982 (Kang *et al.*, 1982). As gelanas são um heteropolissacarídeo aniónico de elevado peso molecular e são o segundo EPS com maior aceitação para aplicações industriais (Crescenzi, 1995). São produzidas por fermentação aeróbica pela estirpe *Sphingomonas paucimobilis* ATCC 31461, formalmente designada por *Pseudomonas elodea* (Crescenzi, 1995; Sutherland, 1994).

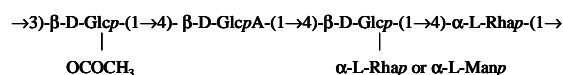
As gelanas fazem parte de uma família de EPS que incluem oito polímeros bacterianos, cuja estrutura é muito semelhante entre eles (Figura 2.1). Nesta família verifica-se que os polímeros apresentam uma estrutura da cadeia principal, geralmente constituída por uma unidade estrutural repetitiva, que é composta por dois resíduos de glucose (Glc), um resíduo de ácido glucurónico (GlcA) e um resíduo de ramnose (Rha), que se encontram distribuídos da seguinte forma: Glc-GlcA-Glc-Rha. No entanto, diferem quanto à natureza e localização de cadeias laterais, assim como quanto à presença ou ausência de grupos acetilo e/ou glicerato. Assim, as *welans* e as *rhamsans*, que são outros

exemplos de polissacarídeos pertencentes a esta família, apresentam uma constituição da cadeia principal igual à das gelanas, que é constituída por Glc-GlcA-Glc-Rha, no entanto apresentam cadeias laterais de monossacarídeos, de ramnose (Rha) ou manose (Man), e dissacarídeos, de glucose (Glc-Glc), respectivamente, as quais lhes conferem diferentes comportamentos quando em solução (Harris, 1990).

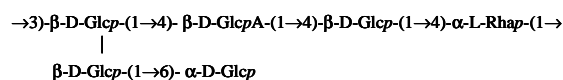
**1. Gellan gum**



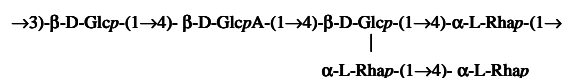
**2. Welan gum (S130)**



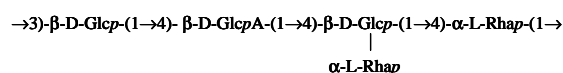
**3. Rhamsan gum (S194)**



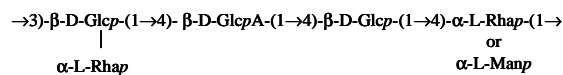
**4. S-657**



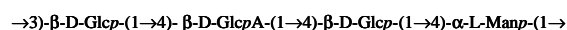
**5. S-88**



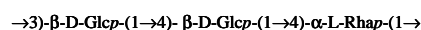
**6. S-198**



**7. NW-11**

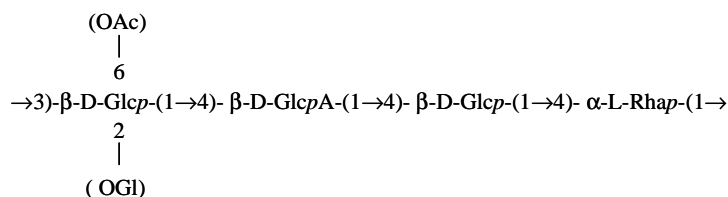


**8. PS-P4**



**Figura 2.1** – Exopolissacarídeos da família das gelanas (adaptado de Banik *et al.*, 2000).

A cadeia principal de uma gelana nativa é então constituída pela repetição de uma unidade estrutural tetrassacarídica composta por D-glucose (Glcp), ácido D-glucurónico (GlcpA) e L-ramnose (Rhap), na proporção de 2:1:1 (Jansson *et al.*, 1983). No entanto, esta cadeia principal pode encontrar-se parcialmente esterificada com grupos acilo; o resíduo 1,3-D-Glcp pode ligar-se a um grupo L-glicetaro (Ogl) no C-2 e/ou a um grupo acetato (OAc) no C-6, encontrando-se na proporção de 1:0.5 (mol de L-glicerato : mol de acetato) por cada unidade estrutural tetrassacarídica (Figura 2.2) (Kuo *et al.*, 1986).



**Figura 2.2** – Estrutura química de uma gelana nativa.

O que determina o potencial para a utilização das gelanas na indústria são as suas propriedades reológicas, as quais são afectadas pela presença dos grupos substituintes, uma vez que são estas cadeias laterais que vão determinar o comportamento reológico destes polissacarídeos, como por exemplo a viscosidade (Sá-Correia *et al.*, 2002; Hashimoto *et al.*, 1997; Gunning *et al.*, 1996; Chandraeskaran *et al.*, 1992). Tal como foi demonstrado por Jay *et al.* (1998), os grupos glicerato são responsáveis por alterações significativas na reologia destes polissacarídeos. Como tal, a desacetilação de gelanas nativas resulta em alterações de géis suaves, elásticos e termorreversíveis, para géis mais duros e, consequentemente, mais frágeis (Jay *et al.*, 1998).

De forma a obter polímeros de gelanas com diferentes propriedades, vários polissacarídeos têm sido produzidos a partir de estirpes modificadas produtoras de gelanas. Estas estirpes são expostas a mutações químicas e a stress ambiental e as colónias são seleccionadas baseadas na sua morfologia (Jay *et al.*, 1998; Richau *et al.*, 1997; Sá-Correia *et al.*, 2002).

Todos os estudos de caracterização estrutural de gelanas efectuados até ao momento são baseados em análises por RMN (RMN de protão –  $^1\text{H}$ -RMN e RMN de carbono -  $^{13}\text{C}$ -RMN) e análises por metilação (Wilson *et al.*, 1996; Jay *et al.*, 1998; Fialho *et al.*, 1999). Com os avanços nas técnicas de espectrometria de massa, estas tornaram-se numa ferramenta indispensável para a identificação, sequenciação e caracterização estrutural de polissacarídeos (Zaia, 2004). Desta forma, o objectivo deste trabalho foi efectuar uma caracterização estrutural de duas gelanas, uma comercial e uma modificada *JB3*, utilizando técnicas de espectrometria de massa com ionização por electrospray.

## 2.2. MATERIAL E MÉTODOS

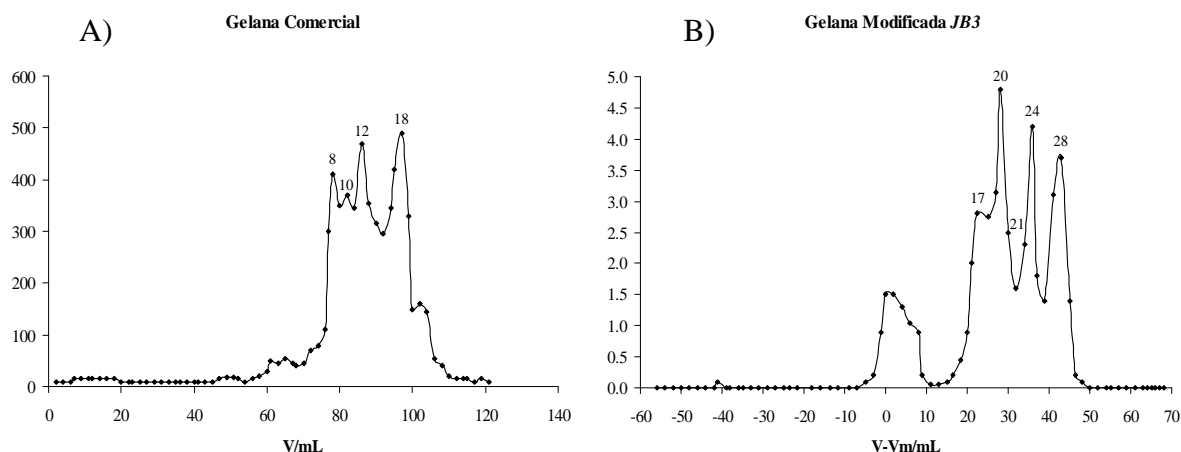
### 2.2.1. Amostras de gelanas

Para o desenvolvimento deste estudo foram utilizadas duas amostras de gelana com origens diferentes, que nos foram fornecidas já hidrolisadas (por hidrólise parcial ácida) e fraccionadas por cromatografia de exclusão molecular. Das duas amostras estudadas, uma amostra corresponde a uma gelana de origem comercial (Fluka Sigma-Aldrich) e uma segunda amostra corresponde a uma amostra de gelana modificada, *JB3*.

A análise de açúcares da gelana modificada *JB3*, revelou que esta gelana é constituída maioritariamente por ramnose (26.3 mol%), glucose (44.1%) e ácido glucurónico (29.6 mol%), o que pode ser descrito, em termos de razões molares, da seguinte forma: 1:1.7:1.1 (Rha:Glc:GlcA).

Ambas as amostras foram isoladas e sujeitas a hidrólise parcial com ácido trifluoroacético (TFA - 50 mM) a 100 °C durante 45 minutos. Posteriormente, as amostras hidrolisadas foram fraccionadas por cromatografia de exclusão molecular, utilizando uma coluna de Biogel P2 e água como eluente, tendo o perfil de eluição sido obtido por um detector ELSD (“evaporative light scattering detection”).

A selecção das fracções de gelana (comercial e modificada *JB3*) para posterior análise foi baseada nos perfis de eluição obtidos por cromatografia de exclusão molecular em Biogel P2 para cada uma das amostras (Figura 2.3). Em ambos os cromatogramas verificou-se a existência de quatro picos, correspondentes a uma maior intensidade no cromatograma obtido por light scattering, ou seja, os quais corresponderiam às fracções de maior concentração em oligossacarídeos. Desta forma, foram seleccionadas as fracções 8, 10, 12 e 18 de gelana comercial e as fracções 17, 21, 24 e 28 de gelana modificada *JB3*, para posterior análise por espectrometria de massa.



**Figura 2.3.** Cromatografia de exclusão molecular em Biogel P2 de: **A)** gelana comercial e **B)** gelana modificada *JB3*.

### 2.2.2. Análise por metilação e GC-MS

Os oligossacarídeos obtidos nas fracções 8 e 10 da gelana comercial e nas fracções 17 e 21 da gelana modificada foram submetidos a análise por metilação.

#### Reacção de metilação

A metilação dos oligossacarídeos foi realizada de acordo com o método proposto por Lindberg e Lonngren (1978).

As amostras contidas em tubos de ensaio foram previamente liofilizadas e colocadas em estufa de vazio (sob vácuo e na presença de pentóxido de fósforo) durante a noite, à temperatura ambiente, sendo o vácuo desfeito com  $N_2$  (g). As amostras secas foram dispersas em 2 mL de DMSO (seco em peneiros moleculares 4A) e colocadas sob agitação para promover a completa dissolução. Em atmosfera de árgon, foram trituradas algumas palhetas de NaOH até formarem um pó fino. Adicionaram-se 50 mg de NaOH em pó à amostra dissolvida em DMSO. As amostras foram deixadas a reagir durante 1 hora à temperatura ambiente, tendo sido colocadas sob agitação durante os primeiros 30 min e deixadas a repousar durante os restantes 30 min.

A solução foi arrefecida em banho de gelo e foi adicionado 1 mL de  $\text{CH}_3\text{I}$  (sob corrente de árgon) e deixado reagir durante 1 hora, com agitação durante os primeiros 30 min e deixado em repouso os restantes 30 min.

Foram adicionados 3 mL de água destilada e os oligossacarídeos foram extraídos com 4 mL de clorofórmio. Após centrifugação durante 1 min a 1000 rpm, a fase aquosa foi removida e a fase orgânica foi lavada mais três vezes por adição de 3 mL de água destilada.

A fase orgânica foi transferida para um tubo seco e o solvente foi removido por evaporação no concentrador de amostras.

Este procedimento foi efectuado duas vezes, isto é, foi efectuada a remetilação das amostras, para evitar os efeitos de submetilação.

### **Redução dos grupos carboxílicos**

Os tubos contendo os resíduos secos das amostras metiladas, foram colocados na estufa de vazio (sob vácuo e na presença de pentóxido de fósforo) durante a noite. A cada tubo foi adicionado, sob corrente de árgon, 20 mg de  $\text{LiAlD}_4$  e 1 mL de tetra-hidrofurano (seco em peneiros moleculares 4A). Os tubos foram devidamente fechados e deixados a reagir durante 4 horas a  $65^\circ\text{C}$ . O excesso de lítio foi destruído por adição de 3 gotas de etanol a 95% seguido de 3 gotas de água. Foram adicionadas algumas gotas de ácido fosfórico 2 M, até se verificar a formação de partículas em suspensão na solução.

Posteriormente, foram adicionados 2 mL de clorofórmio: metanol (2:1 v/v) e o precipitado foi removido por centrifugação a 4000 rpm durante 5 min. O precipitado foi lavado mais duas vezes com a solução clorofórmio:metanol e os sobrenadantes foram recolhidos e posteriormente levados à secura no concentrador de amostras.

### **Hidrólise, redução e acetilação – acetatos de alditol parcialmente metilados**

Os oligossacarídeos metilados e com os grupos carboxílicos reduzidos, foram hidrolisados por adição de 1 mL de ácido trifluoroacético 2 M, durante 1 hora a  $121^\circ\text{C}$ . O TFA foi removido por evaporação no concentrador de amostras.

Os resíduos parcialmente metilados foram reduzidos por suspensão da amostra em 300 µL de uma solução contendo NaBD<sub>4</sub> (67 mg/mL) em NH<sub>3</sub> 2 M, e incubados a 30 °C durante 1 hora. O excesso de NaBD<sub>4</sub> foi removido por adição de 100 µL de ácido acético glacial.

A acetilação foi realizada por adição de 450 µL de 1-metilimidazol e 3 mL de anidrido acético, sendo deixado a reagir durante 30 min a 30°C. O excesso de anidrido acético foi destruído por adição de 4 mL de água e, os acetatos de alditol parcialmente metilados e acetilados foram extraídos por adição de 3 mL de diclorometano. Após centrifugação a 1000 rpm durante 1 min, a fase aquosa foi removida por aspiração e a fase orgânica foi lavada mais 3 vezes com água destilada.

### **Condições cromatográficas para GC-MS**

Os acetatos de alditol parcialmente metilados (dissolvidos em 0,5 – 1 mL de acetona anidra) foram analisados / caracterizados por GC-MS numa coluna DB-1 (30 m de comprimento, 0.32 mm de diâmetro interno e 0.25 µm de espessura de filme). As amostras foram injectadas no modo splitless (tempo de splitless de 1 min), com o injector e o detector a operar à temperatura de 220 °C e 250°C, respectivamente, utilizando o seguinte programa de temperaturas: 45 °C durante 1 minuto, com um aumento linear de 45 °C / min até aos 140 °C onde fica durante 1 min, seguida de um aumento linear de 0.5 °C / min até aos 170 °C, onde permanece durante 1 min, seguido de um aumento linear de 45 °C /min até aos 220 °C, permanecendo a esta temperatura durante 5 min.

A análise por GC-MS foi realizada num cromatógrafo ThermoQuest GC 2000 Trace Series equipado com injector split / splitless e acoplado a um espectrómetro de massa MD Finningan Trace MS, com scans entre os 400-35 m/z/s com uma energia de ionização de 70 eV, com o programa de aquisição e integração Xcalibur.



### **2.2.3. Espectrometria de massa com ionização por Electrospray – ESI-Q -TOF (MS e MS/MS)**

Após fraccionamento por exclusão molecular, as fracções que apresentavam maior intensidade de sinal no cromatograma obtido por light scattering, as quais correspondem a uma maior concentração em oligossacarídeos, foram analisadas por ESI-MS e ESI-MS/MS. Os resíduos secos das amostras seleccionadas foram então dissolvidos em água miliQ.

Espectros de ESI-MS e ESI-MS/MS foram adquiridos no modo positivo, num espectrómetro de massa Q-TOF2 Micromass (Manchester, UK). Para as análises por electrospray, 2-4 µL de solução contendo os oligossacarídeos foi diluída em 200 µL de uma solução 50:50:0.1 (v/v/v) de água:metanol:ácido fórmico. As amostras foram introduzidas na fonte de ESI a um fluxo de 10 µL/min. Tanto nas análises por MS como nas análises por MS/MS a resolução do analisador de massa de tempo de voo (TOF) foi estimada para aproximadamente 9000. A voltagem do cone foi de 35 V e a voltagem aplicada no capilar foi de 3 kV. A temperatura da fonte foi ajustada para 80 °C e a temperatura de dessolvatação foi de 150 °C.

Os espectros de MS/MS foram obtidos utilizando o árgon como gás de colisão, estando as energias de colisão situadas entre os 20 e os 45 eV. Os resultados foram processados utilizando o software MassLynx (versão 4.0).

### **2.2.4. Espectrometria de massa com ionização por Electrospray – Trapa de Iões (MS<sup>n</sup>)**

Para efectuar as análises de sequenciação dos oligossacarídeos identificados foi utilizado o espectrómetro de massa de trapa de iões linear LXQ, (Thermo Finnigan, San Jose), com fonte de ionização de electrospray, operando em modo positivo. Para as análises, 4-8 µL de solução contendo os oligossacarídeos foi diluída em 200 µL de uma solução 50:50:0.1 (v/v/v) de água:metanol:ácido fórmico. As amostras foram introduzidas na fonte utilizando um fluxo de 5 µL/min, com uma voltagem de 5.5 kV, temperatura do

capilar de 350 °C, voltagem do capilar 1V, voltagem de “Tube lens” de 40V, tendo o azoto sido utilizado como gás nebulizador e como gás de arraste.

Os espectros de massa foram adquiridos na gama de valores de  $m/z$  entre os 100 e os 1500. Os espectros de  $MS^n$  foram obtidos fazendo variar a energia de colisão entre 15-25 unidades (unidade de energia de colisão normalizada). Os dados foram adquiridos utilizando o software Xcalibur.

### 2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As fracções de gelana comercial (fracções 8, 10, 12 e 18) e de gelana modificada *JB3* (fracções 17, 21, 24 e 28) seleccionadas, foram analisadas por ESI-MS e ESI-MS/MS, com a finalidade de identificar os oligossacarídeos obtidos, efectuar a sua caracterização estrutural e assim obter informação estrutural das duas gelanas estudadas.

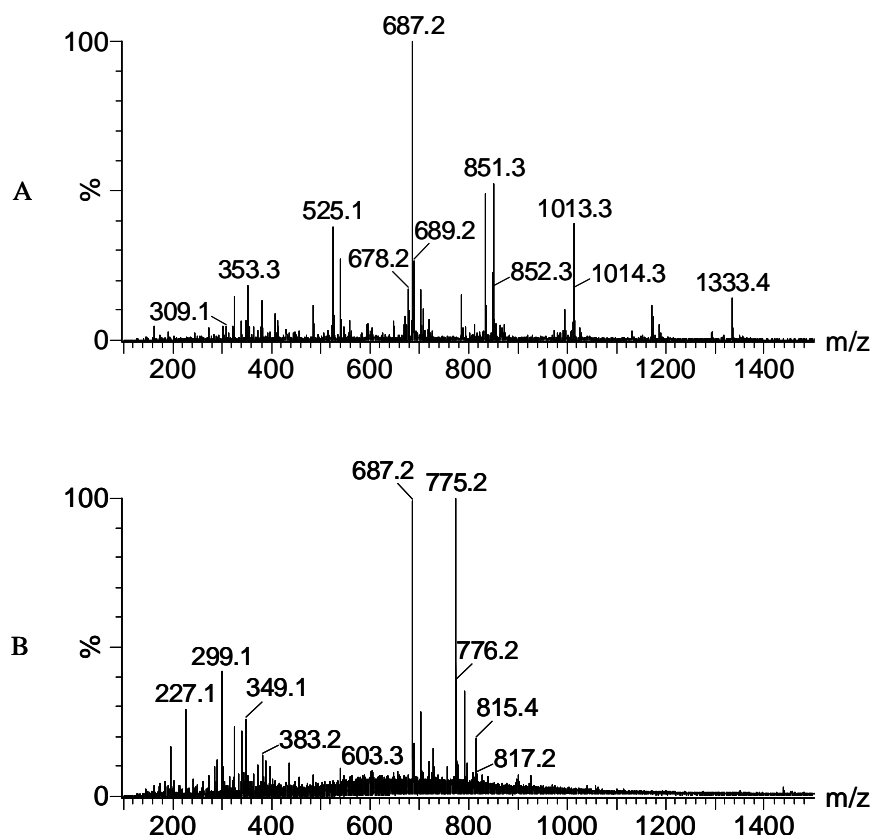
A utilização da ESI-MS permite-nos efectuar a caracterização estrutural de oligossacarídeos mesmo quando presentes em misturas e mesmo estando presentes em pequenas quantidades, sem que seja necessário efectuar qualquer tipo de manipulação / derivatização (Zaia, 2004). Quando se utiliza o electrospray como fonte de ionização, os oligossacarídeos ionizam preferencialmente sob a forma de aductos de sódio,  $[M+Na]^+$ , mesmo sem qualquer tipo de adição de sais de sódio à solução, tal como já foi descrito anteriormente (Cech *et al.*, 2001; Reis *et al.*, 2002).

Através da análise detalhada dos espectros de ESI-MS obtidos para as fracções seleccionadas, foi possível detectar a presença de uma série de oligossacarídeos, apresentando-se todos eles sob a forma de aductos de sódio ( $[M+Na]^+$ ). Os valores de  $m/z$  correspondentes aos oligossacarídeos identificados encontram-se descritos na Tabela 2.1.

Como exemplo dos espectros de massa (ESI-MS) obtidos, apresentam-se na figura 2.4 os espectros obtidos para a fracção 8 da gelana comercial e da fracção 17 da gelana modificada *JB3*.

**Tabela 2.1.** Valores de  $m/z$  correspondentes aos oligossacarídeos identificados nos espectros de ESI-MS, sob a forma de  $[M+Na]^+$ , para a gelana comercial e para a gelana modificada- *JB3*.

Gelana Comercial		Gelana Modificada – <i>JB3</i>	
$m/z$	<i>Identificação</i>	$m/z$	<i>Identificação</i>
525	GlcGlcARha	541	Glc <sub>2</sub> GlcA
541	Glc <sub>2</sub> GlcA	629	Glc <sub>2</sub> OGlGlcA
687	Glc <sub>2</sub> GlcARha	687	Glc <sub>2</sub> GlcARha
833	Glc <sub>2</sub> GlcARha <sub>2</sub>	775	Glc <sub>2</sub> OGlGlcARha
849	Glc <sub>3</sub> GlcARha	833	Glc <sub>2</sub> GlcARha <sub>2</sub>
1025	Glc <sub>3</sub> GlcA <sub>2</sub> Rha	849	Glc <sub>3</sub> GlcARha
1171	Glc <sub>3</sub> GlcA <sub>2</sub> Rha <sub>2</sub>	921	Glc <sub>2</sub> OGlGlcARha <sub>2</sub>
1333	Glc <sub>4</sub> GlcA <sub>2</sub> Rha <sub>2</sub>	937	Glc <sub>3</sub> OGlGlcARha



**Figura 2.4.** Espectro de ESI-MS obtido para a: A) Fracção 8 da gelana comercial; B) Fracção 17 da gelana modificada *JB3*.

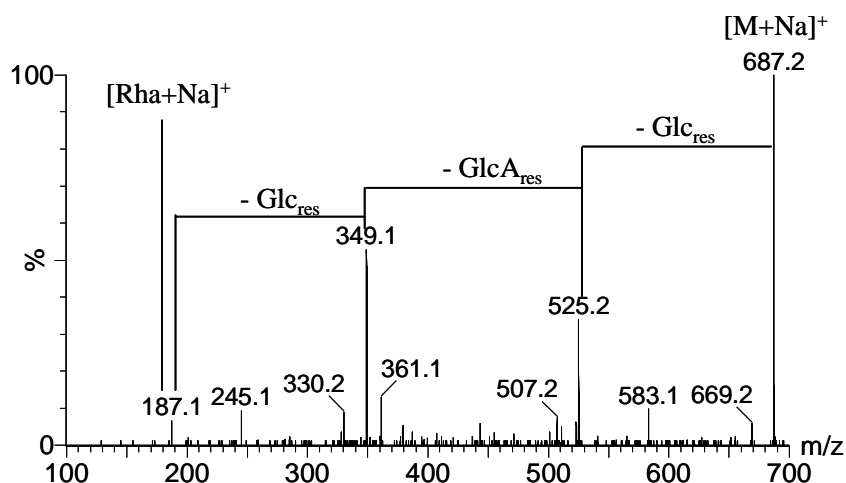
### 2.3.1. Gelana Comercial

A análise dos espectros de massa de ESI-MS relativos à gelana comercial, revelou que o ião mais abundante presente na fracção 8 desta amostra correspondia a um valor de  $m/z$  igual a 687. No entanto, outros iões foram também detectados (nesta e nas restantes fracções desta gelana) para valores de  $m/z$  de 525, 541, 833, 849, 1025, 1171 e 1333, apesar de se encontrarem com valores de abundâncias relativas inferiores. Todos estes iões foram identificados sob a forma  $[M+Na]^+$ , sendo eles correspondentes a oligossacarídeos com diferentes combinações de Glc (glucose), Rha (ramnose) e GlcA (ácido glucurónico). A presença destes oligossacarídeos de diferentes constituições aparece como resultado da clivagem das ligações glicosídicas, durante a hidrólise ácida parcial.

De forma a confirmar qual a composição destes oligossacarídeos, foram obtidos os espectros de ESI-MS/MS relativos a cada um dos iões acima mencionados.

### $m/z$ 687

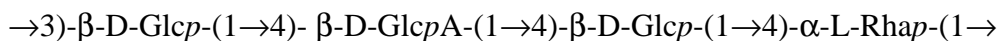
Como já foi referido anteriormente, o ião mais abundante no espectro de MS da fracção 8 da gelana comercial corresponde ao ião de  $m/z$  687. Após obtido o espectro por ESI-MS/MS correspondente a este ião, a análise dos iões fragmento revelou a presença de duas hexoses, uma desoxihexose e um ácido urónico na constituição deste ião (Figura 2.5). Tendo em consideração a análise de açúcares e a caracterização estrutural efectuada anteriormente por outros autores (Kuo *et al.*, 1986; Fialho *et al.*, 1999; Jay *et al.*, 1998), pode concluir-se que as hexoses presentes correspondem a glucose, a desoxihexose corresponde a ramnose e, por último, o ácido urónico corresponde ao ácido glucurónico.



**Figura 2.5.** Espectro de ESI-MS/MS do ião de  $m/z$  687, obtido num ESI-Q-TOF.

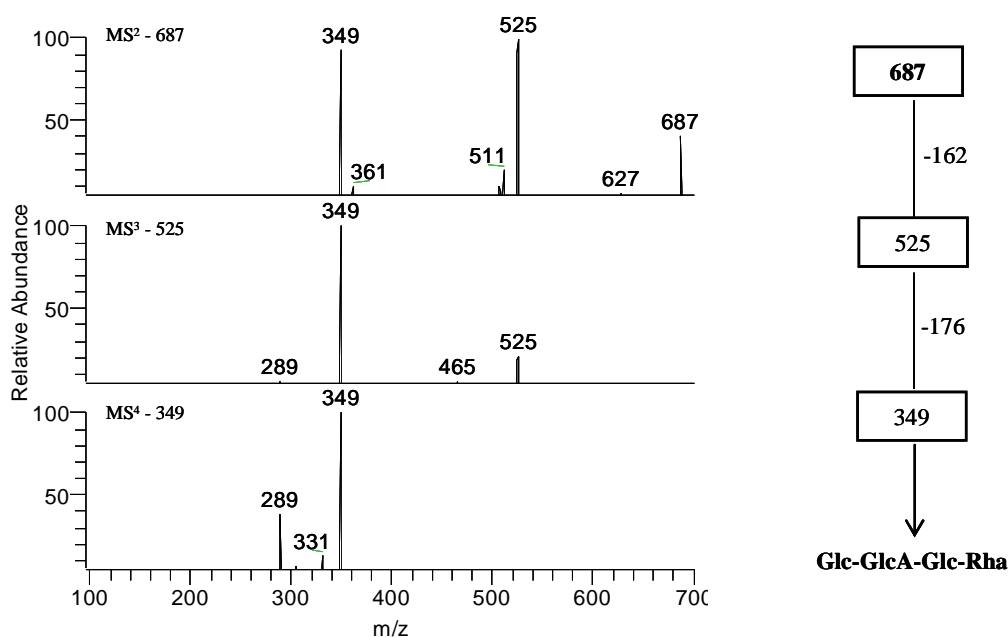
No espectro de MS/MS apresentado na figura 2.5 verifica-se uma perda inicial de 162 Da, correspondente à perda de um resíduo de Glc a partir do terminal não redutor, seguida da perda de 176 Da, correspondente à perda de um resíduo de GlcA, com formação do ião de  $m/z$  349. A partir do ião 349, ainda se verifica a perda de 162 Da, correspondentes à perda de mais um resíduo de Glc, com formação do ião de  $m/z$  187, o qual foi atribuído a uma unidade de Rha do terminal redutor (Reinhold *et al.*, 1996), sob a forma de aducto de sódio ( $[Rha+Na]^+$ ). Assim, este oligossacarídeo corresponde à unidade

tetrassacarídica, **Glc-GlcA-Glc-Rha**, a qual vai de encontro com o que se encontra descrito na literatura (Kuo *et al.*, 1986) e que propõe que a cadeia principal da gelana consiste em dois resíduos de Glc, um resíduo de GlcA e um resíduo de Rha, os quais se encontram distribuídos segunda a configuração apresentada no Esquema 2.1.



**Esquema 2.1.** Unidade repetitiva tetrassacarídica característica da cadeia principal das gelanas.

No entanto, de forma a confirmar a sequência deste oligossacarídeo, foi ainda adquirido o espectro de  $MS^n$ , num espectrómetro de massa de trapa de iões, o qual se encontra representado na figura 2.6.

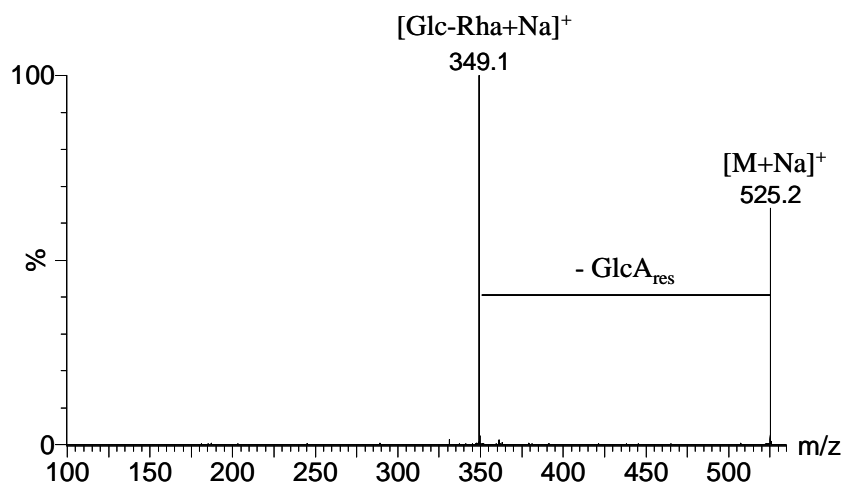


**Figura 2.6.** Espectro de  $MS^n$  obtido para o ião de  $m/z$  687 numa trapa de iões.

A análise dos espectros de  $MS^2$  a  $MS^4$  veio confirmar a sequência deste oligossacarídeo. Desta forma, para o ião de  $m/z$  687 foi atribuída a seguinte estrutura: **Glc-GlcA-Glc-Rha**.

***m/z 525***

O espectro de ESI-MS/MS do ião de *m/z* 525 encontra-se apresentado figura 2.7, o qual apresenta uma fragmentação semelhante à verificada para o ião de *m/z* 687. Verifica-se a perda inicial de 176 Da, correspondente à perda de um resíduo de GlcA e com consequente formação do ião de *m/z* 349, o qual corresponde ao aducto de sódio do dissacarídeo constituído por um resíduo de Rha e um resíduo de Glc,  $[\text{Glc-Rha}+\text{Na}]^+$ , pertencente ao terminal redutor do oligossacarídeo (Reinhold *et al.*, 1996).



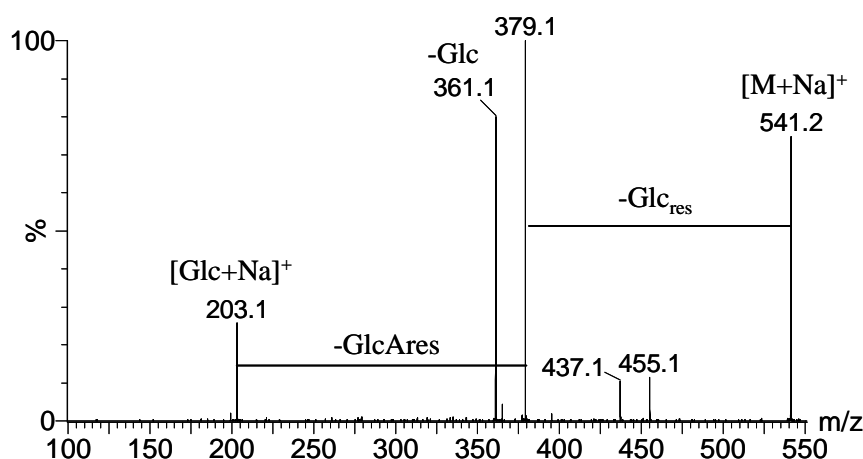
**Figura 2.7.** Espectro de ESI-MS/MS do ião de *m/z* 525, obtido num ESI-Q-TOF.

Através da análise dos fragmentos obtidos no espectro de ESI-MS/MS, foi possível atribuir a seguinte estrutura para o ião de *m/z* 525: **GlcA-Glc-Rha**, o qual corresponde a um trissacarídeo pertencente à unidade estrutural repetitiva da gelana.

***m/z 541***

O espectro de ESI-MS/MS obtido para o ião de *m/z* 541 (Figura 2.8) apresenta um padrão de fragmentação característico dos oligossacarídeos e semelhante ao descrito para os iões anteriores. Inicialmente, verifica-se uma perda abundante de 162 Da, correspondente à perda de um resíduo de Glc, com formação do ião de *m/z* 379. A partir deste verifica-se ainda a perda de 176 Da, correspondente à perda de um resíduo de GlcA, com formação do ião de *m/z* 203, o qual corresponde ao aducto de sódio formado por uma unidade de Glc do terminal redutor,  $[\text{Glc}+\text{Na}]^+$ .

A presença do íon de  $m/z$  361 no espectro pode ser explicada pela perda inicial de uma unidade Glc a partir do terminal redutor, isto é a perda de 180 Da (162 Da + 18 Da), o que vem mais uma vez confirmar a presença de uma unidade de Glc localizada no terminal redutor. Desta forma, foi possível obter informação relevante para a caracterização estrutural do íon de  $m/z$  541, tendo este íon sido identificado como o trissacarídeo constituído por: **Glc-GlcA-Glc**, o qual também corresponde a um trissacarídeo pertencente à unidade repetitiva estrutural das gelanas.

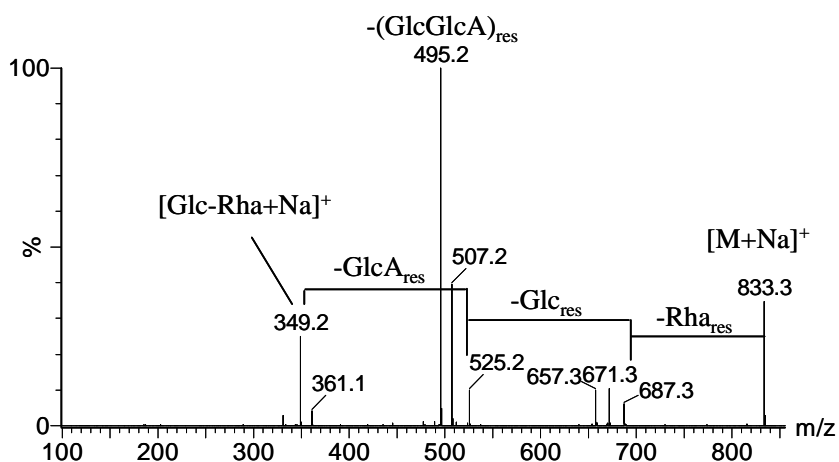


**Figura 2.8.** Espectro de ESI-MS/MS do íon de  $m/z$  541, obtido num ESI-Q-TOF.

### $m/z$ 833

Pela análise do espectro de ESI-MS/MS do íon de  $m/z$  833 (Figura 2.9) é possível inferir que este oligossacarídeo é composto por dois resíduos de Glc, um resíduo de GlcA e dois resíduos de Rha, apresentando-se neste mesmo espectro três vias de fragmentação distintas, as quais correspondem muito provavelmente à presença de três oligossacarídeos isoméricos. Uma das vias de fragmentação identificada, inclui a perda inicial de um resíduo de Rha (- 146 Da), seguida da perda de 162 Da, correspondentes à perda de um resíduo de Glc e posterior perda de um resíduo de GlcA, com formação do íon de  $m/z$  349, o qual corresponde ao aducto de sódio do dissacarídeo Glc-Rha, [Glc-Rha+Na]<sup>+</sup>. Com base nesta via de fragmentação foi possível identificar a presença de uma cadeia linear pentassacarídica, característica das gelanas, constituída pela unidade tetrassacarídica já referenciada anteriormente, com mais um resíduo Rha, de estrutura: **Rha-Glc-GlcA-Glc-Rha**.





**Figura 2.9.** Espectro de ESI-MS/MS do íon de  $m/z$  833, obtido num ESI-Q-TOF.

No entanto, no espectro de MS/MS, é ainda evidente a perda do bloco residual constituído por Glc-GlcA (-338 Da) a partir do íon precursor ( $m/z$  833), com formação do íon de  $m/z$  495. Este íon pode também ser originado pela perda inicial de um resíduo de Glc (para  $m/z$  671) seguida da perda de um resíduo de GlcA e consequente formação do íon de  $m/z$  495. O íon de  $m/z$  495 pode fragmentar por perda de um resíduo de Rha, originando o íon de  $m/z$  349 ( $[\text{Glc-Rha}+\text{Na}]^+$ ). Sendo a estrutura deste isómero: **Glc-GlcA-Rha-Glc-Rha**, não pode ser explicada pela sequência repetitiva da unidade estrutural.

Uma terceira via de fragmentação pode ser seguida através da perda inicial de um resíduo de GlcA (para  $m/z$  657) seguida da perda de um resíduo de Glc, e consequente formação do íon de  $m/z$  495. A partir do íon de  $m/z$  495 verifica-se, tal como anteriormente, a perda de 146 Da, correspondente à perda um resíduo de Rha, com consequente formação do íon de  $m/z$  349, o qual é atribuído ao aducto de sódio,  $[\text{Glc-Rha}+\text{Na}]^+$ . Para este terceiro isómero encontrado foi proposta a seguinte estrutura: **GlcA-Glc-Rha-Glc-Rha**, a qual também não pode ser explicada pela unidade tetrassacarídica característica das gelanas.

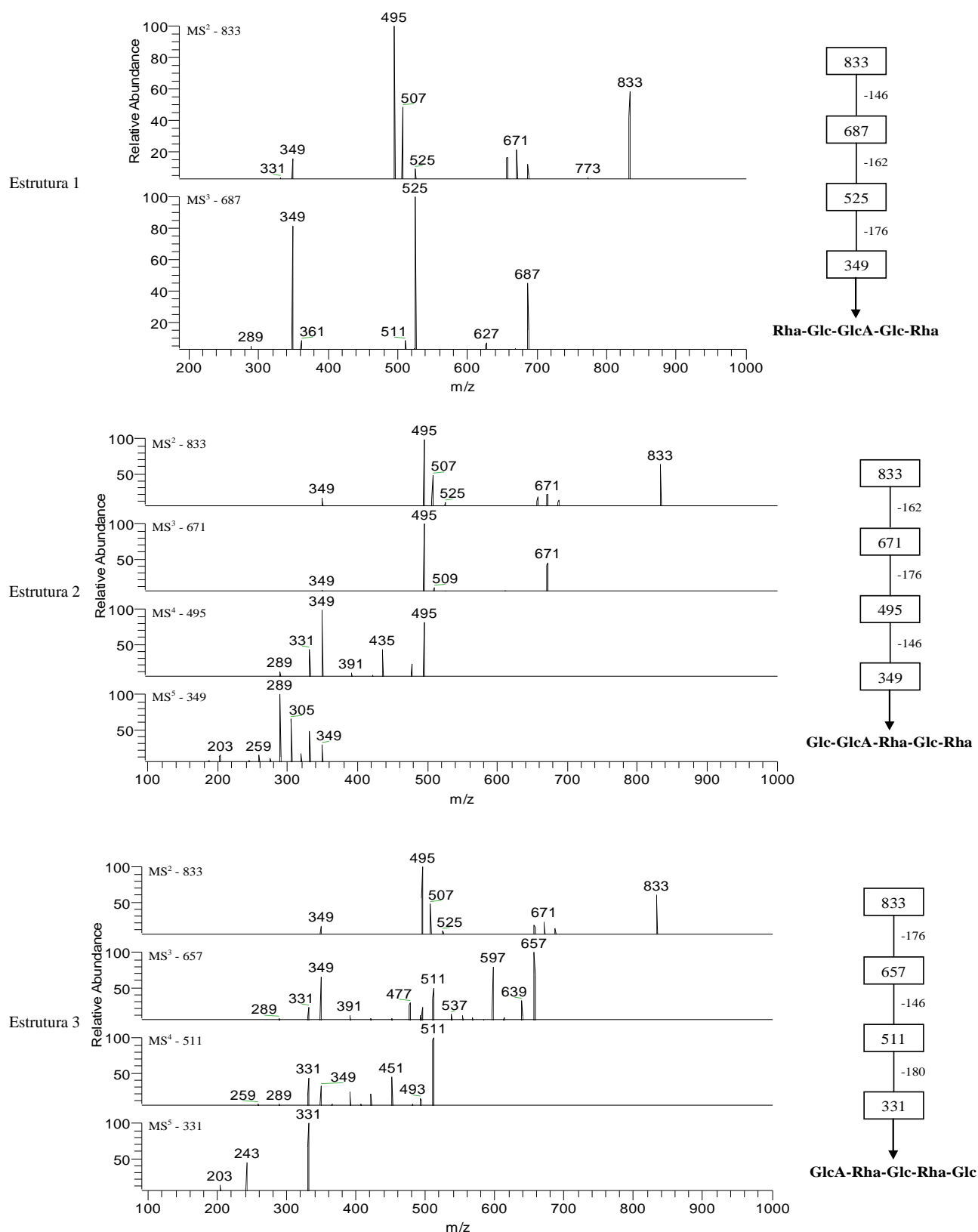
Para confirmar a presença das três diferentes vias de fragmentação e das três estruturas isoméricas, com o intuito de determinar a sequência dos diferentes isómeros apresentados para um mesmo valor de  $m/z$  833, procedeu-se à sua análise por ESI-MS<sup>n</sup>, num espectrómetro de massa de trapa de iões. Os resultados obtidos encontram-se representados na figura 2.10. As estruturas encontradas após sequenciação na trapa de iões, são as seguintes: **Rha-Glc-GlcA-Glc-Rha** (estrutura 1); **Glc-GlcA-Rha-Glc-Rha** (estrutura 2) e **GlcA-Rha-Glc-Rha-Glc** (estrutura 3).

A estrutura 1 (correspondente à primeira via descrita anteriormente) está de acordo com o previsto, isto é, corresponde à unidade estrutural tetrassacarídica que é característica das gelanas, mas neste caso com mais um resíduo de Rha, a qual se encontra ligada ao resíduo de Glc do terminal não redutor.

Quanto às estruturas 2 e 3, admitindo que se tratam de oligossacarídeos lineares, nenhum deles vai de encontro à estrutura base proposta na literatura. No entanto, através da análise por metilação, verificou-se a existência de Glc com ligações 1,2,4, o que pode explicar a presença de tais estruturas, mas considerando a presença de Rha, como ramificação da Glc na posição 2. Desta forma, por exemplo para a estrutura 2, assumindo que se tratava de um oligossacarídeo linear, a estrutura proposta através da sequenciação seria a seguinte: **Glc-GlcA-Rha-Glc-Rha**, no entanto, se se tiver em consideração a possibilidade da existência de uma ramificação da Glc na posição 2 (Glc - 1,2,4) com um resíduo de Rha, então este oligossacarídeo passaria a apresentar a seguinte estrutura:



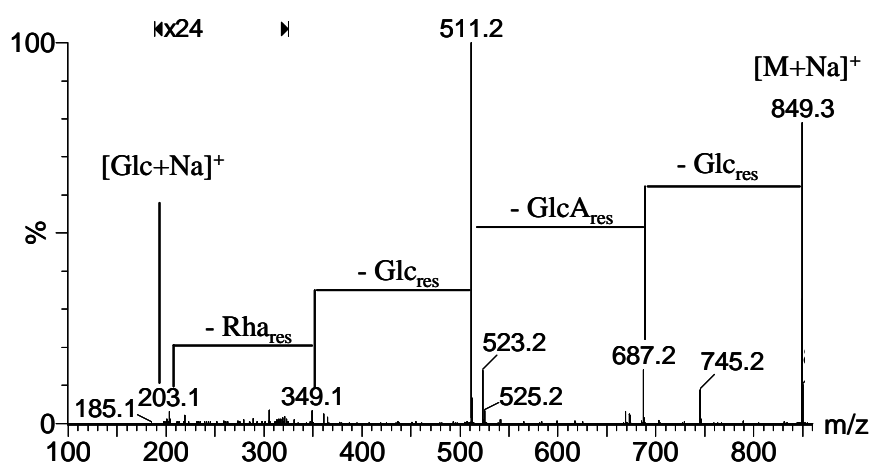
Esta estrutura já vai de encontro ao tetrassacarídeo esperado, apesar de na literatura não se encontrar descrita a presença de ramificações na constituição das gelanas.



**Figura 2.10.** Espectros de  $MS^n$  obtidos num analisador de trapa de iões, para as três diferentes vias de fragmentação encontradas para o ião  $m/z$  833.

**$m/z$  849**

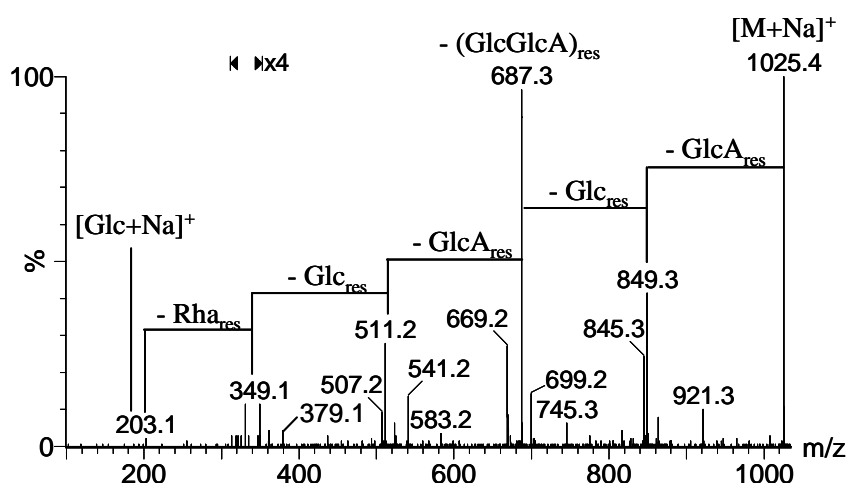
A análise da fragmentação do ião de  $m/z$  849, leva-nos a concluir que este oligossacarídeo é constituído por três resíduos de Glc, um resíduo de GlcA e um resíduo de Rha (Figura 2.11). Na fragmentação deste ião verificou-se a perda de um resíduo de Glc (-162 Da) a partir do terminal não redutor, seguida da perda de um resíduo GlcA, com formação do ião de  $m/z$  511. Apesar de se verificar a presença dos iões relativos às perdas sucessivas de Glc (para  $m/z$  687) e GlcA (para  $m/z$  511) e, à semelhança com o que acontece para o ião de  $m/z$  833, da análise do espectro é bem evidente a perda do bloco (GlcGlcA)<sub>res</sub> (-338 Da) a partir do ião precursor ( $m/z$  849) com formação directa do ião de  $m/z$  511. Se a fragmentação apenas fosse sequencial, os dois iões apresentariam abundâncias relativas semelhantes (Nunes *et al.*, 2005; Reis *et al.*, 2005), o que não se verifica, pois a abundância relativa do ião de  $m/z$  511 é muito superior à abundância relativa do ião de  $m/z$  687. Tal facto sugere que a força da ligação entre os resíduos de Glc e de GlcA pode ser maior do que entre os outros resíduos. Posteriormente, a partir do ião de  $m/z$  511, verifica-se a perda de outro resíduo de Glc (para  $m/z$  349) seguida da perda de um resíduo de Rha, dando origem à formação do ião de  $m/z$  203, o qual corresponde ao aducto de sódio de uma Glc do terminal redutor, [Glc+Na]<sup>+</sup>. Desta forma, através da análise do espectro de MS/MS, foi possível chegar à constituição deste oligossacarídeo, atribuindo-lhe a estrutura: **Glc-GlcA-Glc-Rha-Glc**. Esta estrutura está de acordo com a unidade repetitiva tetrassacarídica característica das gelanas, correspondendo à unidade tetrassacarídica com mais um resíduo de Glc.



**Figura 2.11.** Espectro de ESI-MS/MS do ião de  $m/z$  849, obtido num ESI-Q-TOF.

***m/z 1025***

Para *m/z* 1025, foram detectadas duas vias de fragmentação possíveis no espectro de ESI-MS/MS, encontrando-se descrita na figura 2.12 a principal via de fragmentação. Este oligossacarídeo é composto por seis monossacarídeos, entre os quais se encontram três resíduos de Glc, dois resíduos de GlcA e um resíduo de Rha. No espectro de ESI-MS/MS verifica-se uma perda inicial de um resíduo de GlcA (-176 Da) a partir do terminal não redutor, com formação do ião de *m/z* 849, a partir do qual ocorre a perda de um resíduo de Glc (-162 Da). No entanto e, mais uma vez se verifica que a perda do bloco (Glc-GlcA)<sub>res</sub> é mais abundante, uma vez que a abundância relativa do ião de *m/z* 687 (correspondente à perda de 338 Da a partir do ião precursor) é bastante superior à encontrada para o ião de *m/z* 849. A partir do ião de *m/z* 687, verifica-se a perda de um resíduo de GlcA (e formação do ião de *m/z* 511), seguida da perda de um resíduo de Glc (para o ião de *m/z* 349) e finalmente a perda de um resíduo de Rha, com formação do ião de *m/z* 203, o qual corresponde ao aducto de sódio de uma Glc do terminal redutor, [Glc+Na]<sup>+</sup>. A análise desta via de fragmentação leva-nos a propor a seguinte estrutura para este oligossacarídeo: **GlcA-Glc-GlcA-Glc-Rha-Glc**, o que não é explicado pela sequência da unidade estrutural descrita para as gelanas.



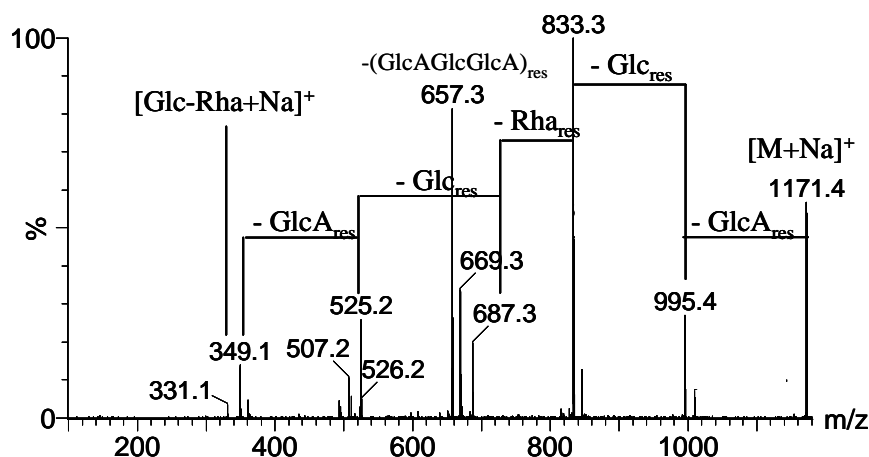
**Figura 2.12.** Espectro de ESI-MS/MS do ião de *m/z* 1025, obtido num ESI-Q-TOF.

É ainda possível detectar, a partir do espectro de ESI-MS/MS, uma segunda via de fragmentação. Nesta segunda via, verifica-se inicialmente a perda de um resíduo de GlcA

(para  $m/z$  849) seguida da perda de um resíduo de Glc, com formação do ião de  $m/z$  687 (tal como se tinha verificado na via de fragmentação identificada anteriormente). Posteriormente, verifica-se a perda de um resíduo de Rha, dando origem ao ião de  $m/z$  541, a partir do qual se verifica a perda de um resíduo de Glc (para  $m/z$  379), seguida da perda de um resíduo de GlcA, dando origem ao ião de  $m/z$  203, correspondente  $[\text{Glc}+\text{Na}]^+$ . Esta segunda via de fragmentação conduz-nos a uma segunda estrutura, **GlcA-Glc-Rha-Glc-GlcA-Glc**, a qual está de acordo com a unidade estrutural característica das gelanas.

### $m/z$ 1171

O padrão de fragmentação do oligossacarídeo correspondente ao ião de  $m/z$  1171 (Figura 2.13), é resultado das perdas consecutivas de resíduos de GlcA ( $m/z$  995), Glc ( $m/z$  833) e Rha, com formação do ião de  $m/z$  687. A partir do ião de  $m/z$  687 verifica a ocorrência de fragmentação igual à observada para o ião com o mesmo valor de  $m/z$  (687) caracterizado anteriormente (Figura 2.5), o qual corresponde ao tetrassacarídeo Glc-GlcA-Glc-Rha. Sendo assim, o oligossacarídeo de  $m/z$  1171, foi identificado como sendo um heptassacarídeo com a seguinte estrutura: **GlcA-Glc-Rha-Glc-GlcA-Glc-Rha**.



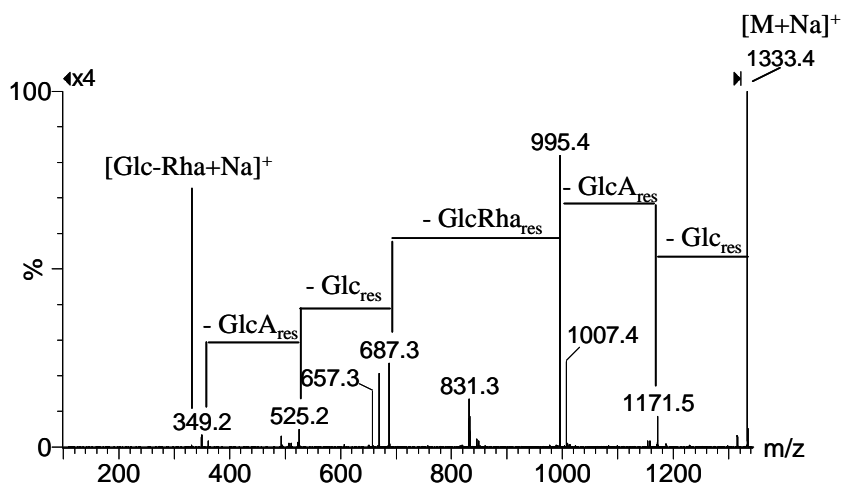
**Figura 2.13.** Espectro de ESI-MS/MS do ião de  $m/z$  1171, obtido num ESI-Q-TOF.

Para além desta via de fragmentação, verifica-se ainda no espectro de MS/MS a presença do ião de  $m/z$  657, o qual corresponde à perda de 514 Da a partir do ião precursor ( $m/z$  1171). Esta perda de 514 Da pode corresponder à perda do bloco GlcA-Glc-GlcA. A

presença de tal fragmento não é característica da estrutura base das gelanas, o que pode reflectir a presença de ramificações ao longo da cadeia de gelana.

### $m/z$ 1333

Por último, foi identificado e caracterizado o ião de  $m/z$  1333 (Figura 2.14) o qual corresponde a duas unidades tetrassacarídicas características das gelanas, isto é: **Glc-GlcA-Glc-Rha-Glc-GlcA-Glc-Rha**. A identificação desta estrutura pode ser verificada a partir da observação do espectro de ESI-MS/MS, o qual apresenta uma perda inicial de um resíduo de Glc, seguida da perda de um resíduo de GlcA (para  $m/z$  995), e posterior perda de um bloco residual de Glc-Rha (-308 Da), com formação do ião de  $m/z$  687, cuja fragmentação é igual à encontrada anteriormente (Figura 2.5), corresponde à unidade tetrassacarídica Glc-GlcA-Glc-Rha. Desta forma foi possível efectuar a caracterização estrutural do oligossacarídeo identificado para o valor de  $m/z$  de 1333.



**Figura 2.14.** Espectro de ESI-MS/MS do ião de  $m/z$  1333 obtido num ESI-Q-TOF.

Curiosamente e, como se pode inferir pelos espectros de MS/MS, o resíduo do terminal não redutor corresponde de um modo geral a um resíduo de Glc ligado a um resíduo de GlcA, o que sugere que a ligação (1→3) existente entre a Rha e a Glc é mais frágil e como tal, mais facilmente quebrada durante a hidrólise parcial ácida.

### 2.3.2. Gelana Modificada – JB3

Os oligossacarídeos obtidos a partir da gelana modificada JB3 foram também analisados por ESI-MS e ESI-MS/MS. Nos espectros de MS verifica-se a presença de iões já encontrados para a gelana comercial, como é o caso dos iões de  $m/z$  541, 687, 833 e 849. No entanto, foram também identificados outros iões, diferentes dos encontrados para a gelana comercial, sendo estes correspondentes a valores de  $m/z$  de 629, 775, 921 e 937.

Da análise do espectro de ESI-MS correspondente à fracção 17 (Figura 2.4 B) obtida por cromatografia de exclusão molecular para a gelana modificada JB3, foi possível verificar que os iões mais abundantes se encontravam para valores de  $m/z$  de 687 e de 775, sendo de salientar que estes iões apresentavam abundâncias relativas bastante semelhantes. Os restantes iões identificados, nesta e nas outras fracções de gelana modificada analisadas, apresentavam abundâncias relativas bastante inferiores.

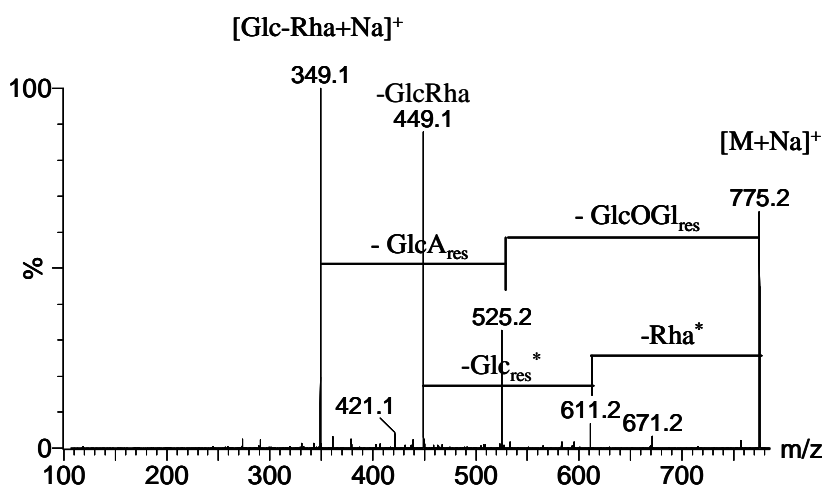
Espectros de MS/MS dos iões identificados foram adquiridos de forma a permitir a sua caracterização estrutural e assim, poder inferir acerca da sua estrutura específica. Os espectros obtidos para os iões comuns à fracção de gelana comercial, apresentaram o mesmo tipo de fragmentação, sendo que estes foram identificados com a mesma estrutura, desta forma, os espectros relativos aos iões de  $m/z$  541, 687, 833 e 849 não serão apresentados neste sub capítulo. Os espectros de MS/MS obtidos para os iões que não tinham ainda sido identificados, iões de  $m/z$  629, 775, 921 e 937, serão apresentados e discutidos de seguida.

#### $m/z$ 775

Como já foi referido anteriormente, o ião de  $m/z$  775 apresenta-se, no espectro de MS relativo à fracção 17 da gelana modificada, com uma abundância relativa semelhante ao ião de  $m/z$  687 (Figura 2.4 B). Este ião apresenta uma diferença de 88 Da relativamente ao ião de  $m/z$  687, correspondente à unidade tetrassacarídica, Glc-GlcA-Glc-Rha. Esta diferença pode ser devida à presença de um grupo glicerato. Através da análise das vias de fragmentação observadas no espectro de MS/MS (Figura 2.15) é possível verificar uma perda inicial de 250 Da, correspondente à perda de um resíduo de Glc ligado a um grupo substituinte glicerato (OGl) (-GlcOGl)<sub>res</sub>. Esta perda levou à formação de um ião de  $m/z$

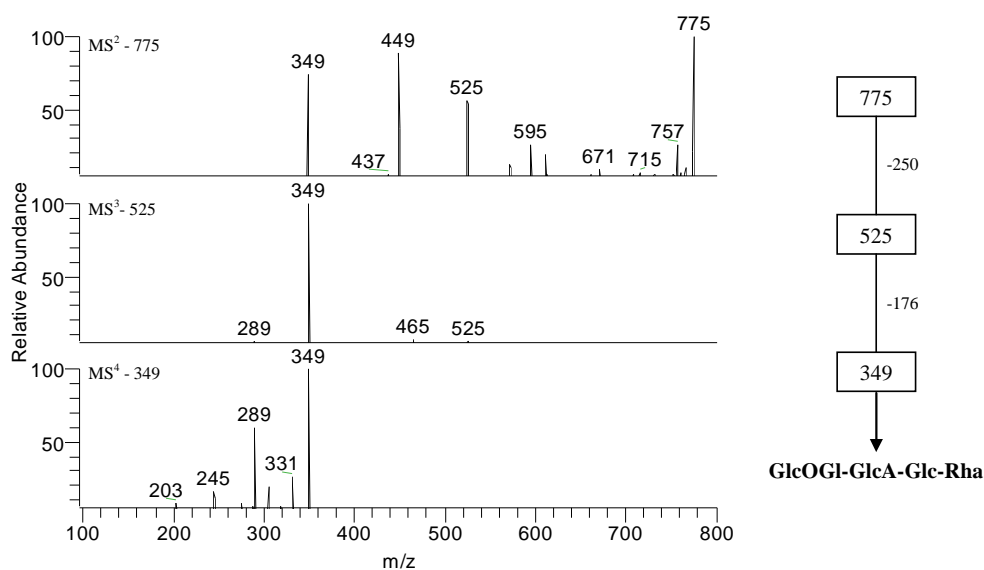


525, a partir do qual se verifica a perda de um resíduo de GlcA (-176 Da) dando assim origem ao íon de  $m/z$  349, o qual corresponde ao bloco, do terminal redutor, constituído por um resíduo de Rha e um resíduo de Glc, mais propriamente:  $[\text{Glc-Rha}+\text{Na}]^+$ . A confirmação da presença de uma Rha no terminal redutor é comprovada pela presença do íon de  $m/z$  611 (Figura 2.15\*), o qual corresponde à perda de 164 Da a partir do íon precursor ( $m/z$  775) (Reinhold *et al.*, 1996).



**Figura 2.15.** Espectro de ESI-MS/MS do íon de  $m/z$  775 obtido num ESI-Q-TOF (\* - corresponde a uma segunda via de fragmentação).

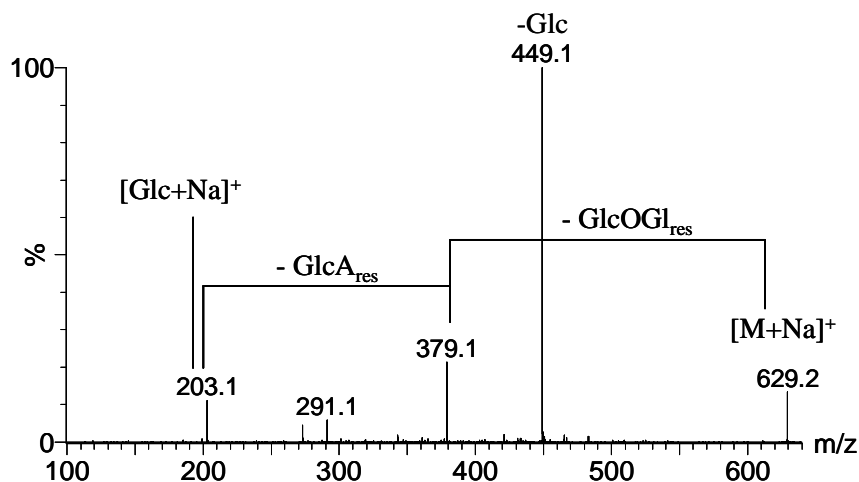
Pela análise do espectro de ESI-MS/MS foi então possível chegar à caracterização estrutural deste oligossacarídeo, tendo este sido identificado como: **GlcOGl-GlcA-Glc-Rha**. A sequência deste oligossacarídeo foi confirmada pela análise dos espectros de  $\text{MS}^n$  numa trapa de iões, a qual se encontra representada na Figura 2.16. confirma-se deste modo a presença de um grupo glicerato como ramificação, na constituição desta gelana modificada.



**Figura 2.16.** Espectro de  $MS^n$  obtido para o ião de  $m/z$  775 numa trapa de iões.

### $m/z$ 629

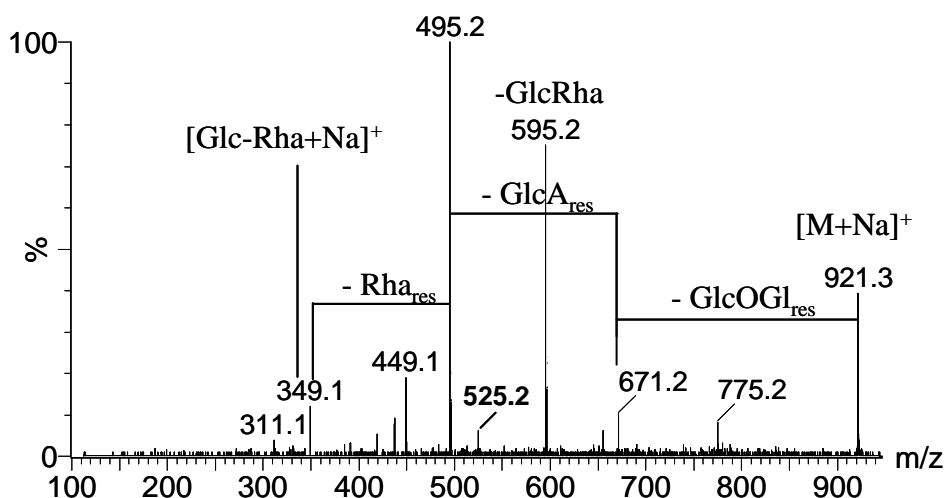
O ião de  $m/z$  629 corresponde ao seguinte trissacarídeo, substituído com um grupo glicerato, **GlcOGl-GlcA-Glc**. A caracterização desta estrutura foi efectuada através da análise da fragmentação observada no espectro de  $MS/MS$  (Figura 2.17). Neste espectro verifica-se a perda inicial de 250 Da a partir do terminal não redutor, como resultado da perda de um resíduo de Glc substituída com um grupo glicerato, com posterior perda de 176 Da relativos à perda de um resíduo de GlcA e consequente formação do ião de  $m/z$  203, correspondente a uma Glc do terminal redutor sob a forma de aducto de sódio,  $[Glc+Na]^+$ . A presença da Glc do terminal redutor (Reinhold *et al.*, 1996) também pode ser comprovada pela perda de 180 Da a partir do ião precursor, com formação do ião de  $m/z$  449.



**Figura 2.17.** Espectro de ESI-MS/MS do ião de  $m/z$  629 obtido num ESI-Q-TOF.

### $m/z$ 921

Pela análise do espectro de ESI-MS/MS obtido para o ião de  $m/z$  921 (Figura 2.18), é possível verificar a perda de um resíduo de Glc com um grupo substituinte OGI ( $-GlcOGI_{res}$ ) com formação do ião de  $m/z$  671 e posterior perda de GlcA (para  $m/z$  495). No entanto a abundância relativa do ião de  $m/z$  495 é bastante superior à do ião para  $m/z$  671, o que parece ser indicativo da perda do bloco  $(Glc(OGI)-GlcA)_{res}$ , tal como se viu para o correspondente oligossacarídeo não substituído com grupos glicerato, através da perda do bloco  $(Glc-GlcA)_{res}$ . Esta observação parece ser indicativa da força da ligação existente entre os resíduos de Glc e GlcA, tal como já foi verificado anteriormente. Após a perda dos resíduos de Glc e GlcA (para  $m/z$  495), verifica-se a perda de um resíduo de Rha, com formação do ião de  $m/z$  349, o qual corresponde ao aducto de sódio  $[Glc-Rha+Na]^+$ . Assim, a estrutura deste oligossacarídeo será, **GlcOGI-GlcA-Rha-Glc-Rha**. Se se considerar este oligossacarídeo como sendo linear, verifica-se que a sua estrutura não vai de encontro à estrutura característica proposta para a constituição das gelanas. No entanto, se forem levados em consideração os resultados obtidos através da análise por metilação, esta sequência pode ser explicada pela presença de uma Glc ramificada com um grupo Rha, mais especificamente a  $Glc-(1\rightarrow4)$ , que se encontra ligada a um resíduo de Rha na unidade estrutural. Desta forma, a estrutura proposta para este oligossacarídeo é a seguinte: **GlcOGI-GlcA-Glc(Rha)-Rha**, sendo o grupo (Rha) considerado como uma ramificação de uma unidade de Glc.



**Figura 2.18.** Espectro de ESI-MS/MS do ião de  $m/z$  921 obtido num ESI-Q-TOF.

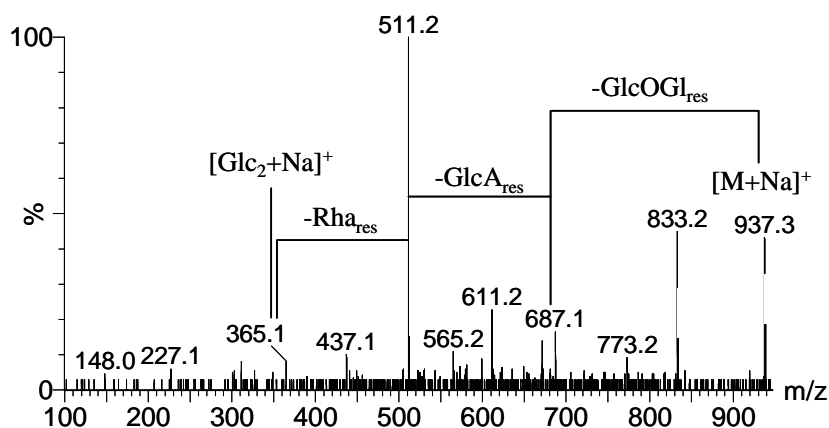
Neste espectro de MS/MS pode ainda verificar-se a presença do ião de  $m/z$  595, a qual corresponde à perda de um bloco a partir do terminal redutor, constituído por uma Glc e uma Rha. Esta perda abundante vem de encontro ao verificado anteriormente, isto é vem confirmar a presença de um grupo (Glc-Rha) no terminal redutor deste oligossacarídeo.

No entanto, é ainda possível observar uma segunda via de fragmentação, apesar de se encontrar em menor abundância. Esta segunda via ocorre por perda de um resíduo de Rha a partir do ião precursor, com formação do ião de  $m/z$  775, a partir do qual ocorre a perda de 250 Da, correspondentes à perda de um resíduo de Glc substituído com um grupo glicerato (para  $m/z$  525). A partir do ião de  $m/z$  525, verifica-se a perda de um resíduo de GlcA, com consequente formação do ião de  $m/z$  349, o qual corresponde ao aducto  $[Glc-Rha+Na]^+$  pertencente ao terminal redutor. Através desta segunda via de fragmentação é possível identificar a presença do pentassacarídeo com a estrutura **Rha-GlcOGl-GlcA-Glc-Rha**, o que leva a sugerir a presença da unidade estrutural característica das gelanas.

### **$m/z$ 937**

Por último foi identificado o ião de  $m/z$  937. No espectro de ESI-MS/MS correspondente a este ião (Figura 2.19), verifica-se mais uma vez a presença de um fragmento com uma abundância relativa bastante elevada, correspondente à perda de um bloco residual de  $(GlcOGl-GlcA)_{res}$ , para  $m/z$  511. No entanto, é também visível a perda de

um grupo residual de GlcOGl a partir do ião precursor, com formação do ião de  $m/z$  687 e, posterior perda de um resíduo de GlcA (para  $m/z$  511). A partir do ião de  $m/z$  511, verifica-se a perda de um resíduo de Rha, com formação do ião de  $m/z$  365, o qual corresponde a um dissacarídeo de Glc, isto é, corresponde ao aducto de sódio  $[\text{Glc}_2+\text{Na}]^+$ . Assim, a estrutura deste oligossacarídeo é **GlcOGl-GlcA-Rha-Glc-Glc**. Esta estrutura não vem de todo ao encontro com o esperado, por um lado porque a Rha se apresenta ou como ramificação ou então está entre um resíduo de Glc e um resíduo de GlcA, e por outro, a presença de dois resíduos de Glc consecutivos, o que não se encontra descrito para a estrutura das gelanas.



**Figura 2.19.** Espectro de ESI-MS/MS do ião de  $m/z$  937 obtido num ESI-Q-TOF.

## 2.4. CONCLUSÃO

A utilização da espectrometria de massa (ESI-MS, ESI-MS/MS e  $\text{MS}^n$ ) revelou ser de extrema importância para a caracterização estrutural das gelanas. Depois de efectuados os espectros de ESI-MS/MS relativos a cada um dos iões identificados nos espectros de ESI-MS, foi possível verificar que existiam alguns iões que eram comuns às duas amostras (iões de  $m/z$  541, 687, 833 e 849), correspondentes a oligossacarídeos sem grupos glicerato e/ou acetato como substituintes, os quais permitiram confirmar a presença da unidade estrutural tetrassacarídica típica da gelanas (Glc-GlcA-Glc-Rha). Foram ainda identificados outros iões que apenas se encontravam nas fracções de gelana modificada

(iões de  $m/z$  629, 775, 921 e 937), os quais correspondiam a oligossacarídeos com grupos glicerato (OGI) como substituintes.

Da análise da Tabela 2.2, pode-se verificar que a correspondência existente entre os iões identificados para as duas amostras (gelana comercial vs gelana modificada *JB3*) está relacionada com a ausência ou presença do grupo OGI como substituinte, respectivamente. A presença deste grupo substituinte só se verifica nas fracções de gelana modificada, como já seria de esperar (Moorhouse *et al.*, 1981, citado por Mazen *et al.*, 1999). No entanto, para esta gelana modificada não foi detectada a presença de grupos acetilo como grupos substituintes.

**Tabela 2.2.** Correspondência entre iões encontrados nas fracções de gelana comercial (sem grupos glicerato) e de gelana modificada *JB3* (com grupos glicerato).

Gelana Comercial		Gelana Modificada	
$[M+Na]^+$	Estrutura proposta	$[M+Na]^+$	Estrutura proposta
541	Glc-GlcA-Glc	629	Glc <b>OGI</b> -GlcA-Glc
687	Glc-GlcA-Glc-Rha	775	Glc <b>OGI</b> -GlcA-Glc-Rha
833	Rha-Glc-GlcA-Glc-Rha	921	Rha-Glc <b>OGI</b> -GlcA-Glc-Rha
	Glc-GlcA-Glc-(Rha)-Rha		Glc <b>OGI</b> -GlcA-Glc-(Rha)-Rha

Após efectuada a caracterização estrutural dos diferentes iões encontrados e, tendo em consideração os espectros de ESI-MS obtidos para ambas as gelanas (Figura 2.4), foi possível retirar algumas elações acerca da distribuição dos diferentes oligossacarídeos identificados.

Por comparação dos espectros de ESI-MS relativos à fracção 8 (gelana comercial) e fracção 17 (gelana modificada *JB3*), verificou-se que para ambas as gelanas, o ião que apresentava maior abundância relativa no espectro era o que correspondia à unidade repetitiva tetrassacarídica das gelanas, de  $m/z$  687. No entanto, para a gelana modificada verificou-se ainda a presença de um outro ião com abundância relativa bastante elevada, para  $m/z$  775. Este segundo ião, tal como foi descrito na secção anterior, correspondia à unidade tetrassacarídica da gelana, mas com um grupo glicerato como substituinte.

Avaliando as abundâncias relativas dos iões de  $m/z$  687 e 775 presentes no espectro de ESI-MS da gelana modificada, verifica-se que ambos apresentam abundâncias idênticas, o que nos leva a sugerir que a presença de grupos OGI ao longo da cadeia, se distribui numa proporção de um grupo OGI por cada duas unidades estruturais tetrassacarídicas características das gelanas. Tal facto foi confirmado através da comparação das abundâncias relativas dos outros pares de iões correspondentes, com e sem grupos OGI como substituintes, nos espectros de ESI-MS das fracções de gelana modificada, como é o caso dos pares de iões de  $m/z$ : 541 e 629; 833 e 921.

Ao longo da análise dos espectros de ESI-MS/MS dos oligossacarídeos que apresentavam OGI na sua constituição, nunca foi encontrada a perda de 106 Da, correspondente à perda de um grupo OGI. A presença deste grupo substituinte apenas foi identificada através da observação da perda de 250 Da, a qual correspondia à perda de um resíduo de Glc substituída com um grupo OGI ( $-\text{GlcOGI}$ )<sub>res</sub>.

Apesar das estruturas propostas para todos os iões identificados irem de encontro à estrutura da unidade básica tetrassacarídica constituinte das gelanas, foi também possível identificar a presença de outros isómeros, cuja estrutura proposta não podia ser explicada pela unidade repetitiva característica das gelanas. Tal facto levou-nos a especular acerca da possível existência de ramificações ao longo da cadeia principal, as quais poderiam não ter sido detectadas até ao momento. Desta forma, foi efectuada a análise por metilação de quatro fracções distintas (duas fracções de gelana comercial e duas fracções de gelana modificada). Este estudo revelou, para além das ligações já esperadas, a presença de 1,2,4-Glcp, a qual nos leva a concluir que de facto existem ramificações ao longo da cadeia principal, na posição 2 da Glcp. Estas ramificações parecem ser essencialmente compostas por resíduos de Rha.

Um outro facto bastante evidente em praticamente todos os espectros de ESI-MS/MS obtidos, está relacionado com a maior abundância relativa de alguns iões fragmento que resultam da perda de blocos de dois resíduos, sugerindo uma maior força de ligação glicosídica entre estes, quando comparado com as outras ligações glicosídicas presentes nos oligossacarídeos estudados. Este é o caso da perda constante de 338 Da, a qual corresponde à perda de um resíduo de Glc ligado a um resíduo de GlcA, por ligação  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4), bem como da perda constante de 326 Da, correspondente à perda de um bloco, a

partir do terminal redutor, de (Glc-Rha), cujos resíduos se encontram também ligados por ligação  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4). A presença deste bloco (Glc-Rha) pode também ser comprovado pela presença do ião abundante de  $m/z$  349, o qual corresponde ao aducto de sódio [Glc-Rha+Na]<sup>+</sup>, que por seu lado não fragmenta facilmente. Tais factos levam-nos a crer que a ligação mais lábil é a ligação  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3) existente entre um resíduo de Rha e um resíduo de Glc, ligação esta que corresponde à ligação entre duas unidades estruturais tetrassacarídicas.





## **CAPÍTULO 3**

# **EXTRACÇÃO, ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE XILANAS DA MADEIRA DE *Paulownia* POR ESPECTROMETRIA DE MASSA**



### 3.1. CONSIDERAÇÕES TEÓRICAS

O aumento da utilização de madeira para a produção da pasta de papel, está a conduzir a um grave problema ambiental, o qual está relacionado com a desflorestação. Por esta razão, têm vindo a ser desenvolvidos vários trabalhos de investigação centrados na procura de novas matérias-primas (Jiménez *et al.*, 1997). Deste ponto de vista, a *Paulownia* surge como uma matéria-prima de interesse, isto porque se trata de um tipo de madeira que se desenvolve rapidamente, sem necessitar de grandes quantidades de água e, em condições apropriadas, esta espécie pode crescer cerca de 15-18 m. Este crescimento pode ocorrer em apenas cinco anos, sendo a produção anual superior a 150 tons/ha (Jiménez *et al.*, 2005).

A *Paulownia*, é uma madeira do tipo *hardwood* (planta folhosa), originária da China, sendo já conhecida há mais de 2600 anos. As suas características, tais como a sua elevada resistência a doenças, a sua estabilidade dimensional, bem como o seu elevado ponto de ignição, conferem-lhe grande popularidade no mercado da madeira (Bergmann, 1998; Jiménez *et al.*, 2005). A *Paulownia* é também conhecida por ser uma planta de crescimento rápido, muito utilizada para a manufactura de contraplacados, móveis e instrumentos musicais (Curley, 1993; Kalaycioglu *et al.*, 2005), bem como para a produção de pasta de papel (Osion *et al.*, 1985; Jiménez *et al.*, 2005). Estas características explicam o recente aumento na plantação de culturas de *Paulownia* no sul da Europa, mais propriamente na Península Ibérica, sendo que a primeira plantação da espécie híbrida de *Paulownia elongata* / *Paulownia fortunei* em Portugal, teve lugar no norte do país há cerca de quatro anos atrás (Silvestre *et al.*, 2005).

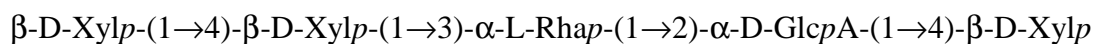
O crescente interesse na madeira de *Paulownia* estimulou os estudos das estruturas dos seus constituintes principais, onde se destacam a celulose e as xilanas, como constituintes maioritários. Estes constituintes são aliás, factores determinantes importantes para as propriedades básicas da pasta celulósica. (Jiménez *et al.*, 2005; Caparrós *et al.*, 2007a; Caparrós *et al.*, 2007b).

As xilanas são polissacarídeos não celulósicos maioritários da madeira e, encontram-se predominantemente na parede primária e secundária da parede celular. No entanto, a sua composição varia, dependendo do tipo de planta em causa, isto é, a estrutura das xilanas difere

das plantas resinosas (*softwood*) para as plantas folhosas (*hardwood*) e mesmo dentro de cada classe.

As xilanas são então constituídas por uma cadeia linear principal composta por unidades de xilose ligadas por ligações glicosídicas  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4). No caso das xilanas isoladas a partir de *hardwoods*, as cadeias de xilanas são ramificadas, em intervalos irregulares, com grupos de ácido 4-*O*-metil-glucurónico (MeGlcA), através de ligações glicosídicas  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 2) nas unidades de xilose. Muitos dos grupos OH dos carbonos C2 e/ou C3 das unidades de xilose, podem ainda apresentar-se substituídos por grupos *O*-acetil (Ac) (Fengel *et al.*, 1984). As xilanas presentes no *Eucalyptus Globulus* apresentam ainda resíduos de hexoses, galactose/glucose, ligados aos resíduos de ácido 4-*O*-metil-glucurónico (Reis *et al.*, 2005; Reis *et al.*, 2004; Evtuguin *et al.*, 2003; Shalatov *et al.*, 1999). O grau de polimerização destas xilanas pode variar entre 100 e 200, dependendo da espécie de madeira em causa, assim como do método de extracção utilizado. Muitas das xilanas isoladas de várias espécies de *hardwoods* apresentam uma razão molar de aproximadamente um grupo MeGlcA por cada dez unidades de Xyl (1:10, MeGlcA:Xyl). Relativamente à proporção de grupos acetilo, esta pode variar ligeiramente entre espécies de *hardwoods* distintas, sendo que a sua razão molar pode variar entre 0.5:1 e 0.6:1 grupos Ac por cada resíduo de Xyl (Ac:Xyl) (Fengel *et al.*, 1984; Shimizu; 1991). Teleman *et al.* (2002) efectuaram a caracterização estrutural de xilanas isoladas a partir de madeira de faia negra e bétula (duas espécies de *hardwood*) e concluíram, através de estudos por RMN, que este tipo de xilanas apresentava na sua constituição MeGlcA, na proporção de 1 resíduo de MeGlcA por cada 15 resíduos de Xyl, sendo o grau médio de acetilação para estas xilanas de 0.4. Para amostras de xilanas isoladas a partir de madeira de faia foram encontrados graus de acetilação mais elevados, na ordem dos 0.6 (Teleman *et al.*, 2000). Relativamente à madeira de eucalipto também foram realizados estudos por RMN, os quais apresentaram, para este tipo de xilanas, razões molares na ordem de 1 MeGlcA:10 Xyl e graus de acetilação de 0.61 (Evtuguin *et al.*, 2003).

Ligadas às unidades principais de xilanas de *hardwoods* podem ainda surgir pequenos vestígios de ramnose (Rha) e ácido galacturónico (GalA). Alguns estudos revelaram ainda que o terminal redutor das xilanas consiste numa combinação de unidades de xilose, ramnose e ácido glucurónico, os quais se encontram distribuídos segundo a sequência esquematizada no Esquema 3.1 (Fengel *et al.*, 1984).



**Esquema 3.1.** Constituição do terminal redutor das xilanas (Fengel *et al.*, 1984).

No entanto, no caso de madeiras do tipo resinosas (*softwood*), a constituição das xilanas apresenta algumas diferenças. Em geral, a principal diferença entre as xilanas proveniente de *softwoods* comparativamente com xilanas provenientes de *hardwoods*, está relacionada com a diminuição do grau de acetilação e, com a presença de unidades de arabinofuranose ligadas à cadeia principal de xilana através de ligações glicosídicas  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3), sendo então denominadas por arabinoxilanas (Fengel *et al.*, 1984).

Comparativamente às xilanas obtidas a partir de *hardwoods*, as xilanas obtidas a partir de *softwoods* apresentam na sua constituição uma maior quantidade de grupos de ácido 4-*O*-metil-glucurónico. Sendo que na maioria dos trabalhos efectuados com amostras provenientes de *softwoods*, a razão molar entre os resíduos de xilose e de ácido 4-*O*-metilglucurónico encontra-se numa proporção de 1:5-6 (MeGlcA:Xyl), podendo também por vezes aparecer na proporção de 1:3-4 (MeGlcA:Xyl), sendo que esta distribuição ao longo da cadeia de xilose, geralmente, se encontra de uma forma regular (Fengel *et al.*, 1984; Jacobs *et al.*, 2000). Relativamente à frequência de observação de resíduos de arabinose ao longo da cadeia principal de xilana, verificou-se que a razão molar se encontra numa proporção de 1:6-10 (Ara:Xyl). De uma forma geral podem-se representar as razões molares dos três componentes nas seguintes proporções: 8:1.6:1 (Xyl:MeGlcA:Ara).

As moléculas de xilanas isoladas a partir de *softwoods* parecem ser mais pequenas do que as isoladas a partir de *hardwoods*, tal como pode ser comprovado através dos valores de DP obtidos para as xilanas de *softwoods*, que se encontram entre os 70 e os 130 (Fengel *et al.*, 1984).

As xilanas da madeira de *Paulownia* não foram ainda caracterizadas estruturalmente pelo que foi objecto de estudo deste trabalho. Para tal as xilanas foram extraídas e isoladas por métodos já descritos e caracterizadas por análise de açúcares, RMN e espectrometria de massa (ESI-MS, ESI-MS/MS e MALDI-MS).

## 3.2. MATERIAL E MÉTODOS

### 3.2.1. Amostras

A realização deste estudo teve como objectivo principal, a caracterização estrutural das xilanas de uma madeira híbrida da espécie *Paulownia elongata* / *Paulownia fortunei* (Figura 3.1).

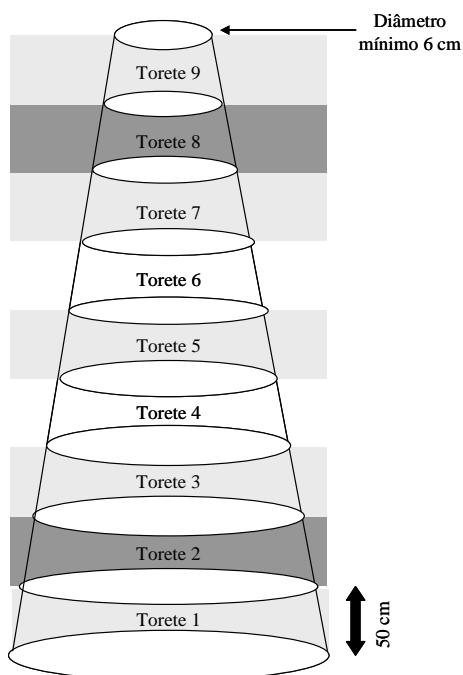
As amostras utilizadas neste estudo foram amostras de madeira híbrida de *Paulownia* (*elongata/fortunei*) com aproximadamente 3.5 anos. Estas amostras foram fornecidas pelo RAIZ (Instituto Português de Investigação da Floresta e da Madeira).



**Figura 3.1.** Fotografia de um exemplar de uma árvore de *Paulownia elongata* / *Paulownia fortunei* híbrida com aproximadamente 3.5 anos.

### 3.2.2. Abate da árvore para estudo

Foi escolhida uma árvore com um nível de crescimento representativo da plantação em geral. Após o corte, a árvore foi cortada em toretes, tal como se encontra representado na Figura 3.2.



**Figura 3.2.** Esquema representativo da forma de recolha dos toretes para amostragem (torestes com número ímpar, foram recolhidos para amostra; toretes com número para não foram recolhidos; toretes número 2 e 8 foram recolhidos para exposição).

### 3.2.3. Preparação do serrim da madeira

Foram cortadas estilhas dos diferentes toretes obtidos (apenas os toretes correspondentes a número ímpar). As estilhas paralelipédicas, de características uniformes, foram deixadas a secar à temperatura ambiente durante duas semanas. Após estarem bem secas, foram moídas num moinho de martelos (Restsch SK1) e o serrim foi peneirado, tendo sido recolhida a fracção de granulometria entre 40-60 mesh (425  $\mu\text{m}$  a 250  $\mu\text{m}$ ).

### 3.2.4. Determinação da humidade relativa

A percentagem de humidade do serrim da madeira foi determinada por diferença de massas. Colocou-se uma caixinha de pesagem na estufa a 105 °C durante 1 hora. Após este período a caixinha foi retirada da estufa e deixada a arrefecer, até à temperatura ambiente, num exsiccador. A caixinha foi pesada e, posteriormente foram pesados cerca de 1.00 g de amostra para dentro da caixinha. Esta foi colocada numa estufa a 105 °C durante uma



noite. Após este período, a caixinha foi arrefecida num exsiccador e, a sua massa foi determinada. O cálculo da percentagem de humidade foi efectuado por diferença de massas. O ensaio foi efectuado em duplicado.

### **3.2.5. Extractáveis solúveis em água**

Num balão de fundo redondo foram colocadas aproximadamente 10.00 g de amostra e 250 mL de água destilada e algumas esferinhas de porcelana para regular a ebulição. Colocou-se o balão sob aquecimento e deixou-se em refluxo durante 60 min. Após os 60 min, desligou-se o aquecimento e deixou-se a solução arrefecer ligeiramente. Posteriormente a solução foi filtrada com Funil de Buchner com filtro previamente pesado. A serradura da madeira foi deixada a secar ao ar.

### **3.2.6. Extractáveis solúveis em acetona**

A quantificação de extractáveis solúveis em acetona foi efectuada segundo a norma Tappi T 204 om-88, com algumas alterações. Foi efectuada uma extracção a 7.00 g de amostra (após extracção com água) em Soxhlet com 200 mL de acetona. Colocou-se a montagem sob aquecimento e deixou-se a refluxar durante 6 horas.

O conteúdo do cartucho foi deixado a secar ao ar e, o resíduo que se depositou no balão foi levado até à secura (em evaporador rotativo) em balão previamente pesado.

### **3.2.7. Deslenhificação com ácido peracético**

A deslenhificação do extracto de madeira obtido após extracção com acetona foi efectuada com ácido peracético. Num balão de fundo redondo foram pesadas cerca de 5,00 g de serradura obtida após extracção com acetona e foram posteriormente adicionados 200 mL de solução de ácido peracético (11 %, v/v). Esta mistura foi colocada (sob agitação) num banho de óleo a 95 °C durante cerca de 25 – 30 min. Quando se verificou que a

serradura apresentava uma cor branca, o balão foi retirado do aquecimento e deixado arrefecer ligeiramente. Posteriormente, esta solução foi filtrada em filtro de placa porosa (sob vácuo). Depois de toda a solução filtrada, os resíduos foram lavados com acetona e de seguida com água quente, até que a água de lavagem atingiu um pH neutro (o objectivo deste passo foi efectuar a neutralização da solução). Por fim, voltou-se a lavar o resíduo com acetona, para facilitar a secagem do resíduo. A placa porosa contendo o resíduo deslenhificado foi colocada em exsiccador sob vácuo para facilitar a sua secagem.

### **3.2.8. Extracção e Isolamento das xilanas**

#### **Extracção das xilanas**

Cerca de 1,5 g de serradura (obtida após deslenhificação) foram colocadas num moinho de bolas de zircónio e agitadas, com a finalidade de provocar a quebra das paredes celulares. Após vários ciclos de agitação, a serradura foi pesado para um balão de fundo redondo com tampa e, foram adicionados cerca de 60 mL de DMSO por cada grama de serradura. A mistura foi colocada num banho de óleo a 60 °C durante 24 horas (sob agitação). Passadas 24 horas, o sobrenadante foi decantado e guardado. À serradura que permaneceu no balão foram adicionados cerca de 50 mL de DMSO e voltou-se a colocar a 60 °C durante 24 horas. Após as 24 horas, o sobrenadante foi novamente decantado e foi adicionado ao sobrenadante decantado no dia anterior. O balão foi então lavado com um pouco de água (o mínimo necessário) e a serradura foi seca ao ar.

#### **Isolamento das xilanas**

Colocaram-se cerca de 900 ml de uma solução de etanol:metanol (7:2 v/v) num erlenmeyer de 1 L sob agitação. A esta solução foi-se adicionando lentamente a solução de DMSO obtida anteriormente. Após a solução começar a turvar, foi adicionada uma pequena quantidade de ácido fórmico ( $\approx 10$  a 20 mL), até se começar a verificar a formação de precipitado. Depois de se começar a formar o precipitado, a solução foi retirada da agitação e, foi deixada a repousar a 4 °C durante 3 dias. Após estes dias de

repouso, a solução foi centrifugada e, o precipitado obtido foi lavado 3 vezes com metanol absoluto. Após as lavagens, o sobrenadante foi decantado e o precipitado, recolhido (xilanas) após centrifugação, foi deixado a secar num exsiccador sob vácuo, durante aproximadamente 2 h 30 min.

### 3.2.9. Análise de açúcares neutros das xilanas

Os polissacarídeos foram sujeitos a uma hidrólise total por tratamento de 10 mg de xilanas isoladas, com 400 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 72%, a 25 °C durante 3 horas, seguindo-se nova hidrólise ácida, durante 2 horas e 30 min a 100 °C, após adição de 4.4 mL de água destilada (hidrólise de Saeman). Os monossacarídeos foram analisados como acetatos de alditol (Coimbra *et al.*, 1996). O hidrolisado foi arrefecido em gelo e, posteriormente foram adicionados 200 µL de 2-desoxiglucose ( $\approx$  15.9 mg/mL) como padrão interno. De seguida neutralizou-se 1 mL da mistura anterior com 200 µL de solução de NH<sub>3</sub> a 25% e, em seguida, para reduzir os monossacarídeos a alditóis, adicionaram-se 100 µL de NH<sub>3</sub> 3 M, contendo 150 mg/mL de NaBH<sub>4</sub>. Após 1 hora a 30 °C, arrefeceu-se a solução em gelo e adicionou-se ácido acético glacial (2 vezes 50 µL) (para decompor o excesso de NaBH<sub>4</sub> em solução). Por fim procedeu-se à acetilação dos alditóis por adição de 0.45 mL de 1-metilimidazol e 3 mL de anidrido acético a 0.3 mL da solução anterior. Esta solução foi mantida a 30 °C durante 30 min. Os acetatos de alditol foram extraídos com diclorometano e a fase orgânica foi lavada com água. Evaporou-se o solvente em corrente de azoto.

Os acetatos de alditol (injecção de 2µL) foram separados por cromatografia em fase gasosa (GC), Carlo Erba 6000 com detector de ionização de chama (FID), utilizando uma coluna polar intermédia DB-225 da J&W (30m x 0,25mm d.i., com 0,15µm de espessura de filme), com velocidade do gás de arraste (hélio) de 1mL/min. O programa de temperaturas do forno utilizado foi: temperatura inicial de 220°C (5 min), aumento de temperatura de 10°C/min até 230°C (6 min). As temperaturas do injector e do detector foram de 220 e 230°C respectivamente.

### 3.2.10. Análise de ácidos urónicos

A determinação dos ácidos urónicos foi efectuada através do método colorimétrico, seguindo os procedimentos já descritos anteriormente por Coimbra *et al.* (1995) e por Blumenkrantz *et al.* (1973).

Após hidrólise com ácido sulfúrico 1M durante 1 hora a 100°C, foram retirados 500 µL que foram diluídos por adição de 1,5 mL de água. A cada três tubos de ensaio foram adicionados 500 µL da solução diluída de amostra. Os tubos foram arrefecidos em gelo, após o que foram adicionados 3,0 mL de uma solução de ácido sulfúrico concentrado, contendo 50 mM de ácido bórico. Após agitação, os tubos foram aquecidos num banho de água em ebulição durante 10 min. Após arrefecimento, a dois dos três tubos contendo a amostra, foram adicionados 100 µL de uma solução de 3-fenilfenol a 0.15% em 0.5% de NaOH, e ao terceiro tubo foram adicionados 100 µL de solução de NaOH a 0.5%. todos os tubos foram deixados em repouso no escuro durante 30 min, para que ocorresse o desenvolvimento da cor.

A absorvância foi determinada a 520 nm para as amostras e o branco e, ao valor das absorvâncias obtidas para cada amostra foi subtraído o valor da absorvância obtido para o respectivo branco.

O conteúdo em ácidos urónicos foi determinado utilizando uma recta de calibração utilizando o ácido galacturónico como padrão (100 µg/mL) por interpolação na gama de concentrações entre 5 e 50 µg/mL.

### 3.2.11. Espectroscopia de RMN de protão

#### RMN de $^1\text{H}$

As xilanas isoladas pelo método de extracção em DMSO foram dissolvidas em  $\text{D}_2\text{O}$  e o espectro foi adquirido (a 25 °C ou 60 °C) num espectrómetro Bruker AMX 300, operando a 300.13 MHz. As condições de operação foram: tempo de relaxação de 10.2 µs, pulso de 90°, 500 scans e intervalos de 12s. Os desvios químicos foram referenciados relativamente ao 3-(trimetilsilil)-propionato de sódio-  $d_4$  ( $\delta$  0.00).

## RMN 2D ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ )

O espectro de TOCSY 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (*Total correlation spectroscopy*) ( $\tau_{\text{mix}} = 0.050$  s) foi adquirido, operando a largura de 2185 Hz em ambas as direcções ( $t_1$  e  $t_2$ ). O tempo de relaxação foi de 2.0 s. Para cada FID 128 transitórios foram adquiridos; o tamanho de matriz de dados foi 1024 em  $t_1$  x 512 em  $t_2$ .

### 3.2.12. Hidrólise parcial ácida dos xilo-oligossacarídeos

Os xilo-oligossacarídeos foram obtidos por hidrólise parcial ácida das xilanas isoladas inicialmente. A cerca de 3.0 mg de xilanas isoladas pelo método descrito anteriormente, foram adicionados 2 mL de ácido trifluoroacético (TFA) 50 mM. A mistura foi deixada a reagir a 105 °C durante 1 hora e 30 min e, de seguida retirada do banho e arrefecida imediatamente à temperatura ambiente.

### 3.2.13. LEX-SEC

Após hidrólise parcial ácida, os xilo-oligossacarídeos foram separados por LEX-SEC, num cromatógrafo de HPLC semi-preparativo Knauer usando uma coluna Shodex sugar KS 2002 (300 mm x 20 mm) e como eluente uma solução de pH 6.5 preparada com água ultra-pura com velocidade de fluxo de 2.80 mL/min. O volume de amostra injectado foi de 500  $\mu\text{L}$ . O perfil de eluição foi monitorizado usando um detector de índice de refração Knauer K-2401 (RI).

#### **3.2.14. Espectrometria de massa com ionização por Electrospray – ESI-Q TOF (MS e MS/MS)**

Após fraccionamento por LEX-SEC, as cinco fracções recolhidas (F1, F2, F3, F4 e F5) foram analisadas por ESI-MS e ESI-MS/MS. Os resíduos secos das amostras seleccionadas foram então diluídos em água miliQ.

Espectros de ESI-MS e ESI-MS/MS foram adquiridos no modo positivo, num espectrómetro de massa Q-TOF2 Micromass (Manchester, UK). Para as análises por electrospray, 2-4 µL de solução contendo os oligossacarídeos foi dissolvida em 200 µL de uma solução 50:50:0.1 (v/v/v) de água:metanol:ácido fórmico. As amostras foram introduzidas na fonte de ESI a um fluxo de 10 µL/min. Tanto nas análises por MS como nas análises por MS/MS a resolução do analisador de massa de tempo de voo (TOF) foi de aproximadamente 9000. A voltagem do cone foi de 35 V e a voltagem aplicada no capilar foi de 3 kV. A temperatura da fonte foi ajustada para 80 °C e a temperatura de dessolvatação foi de 150 °C.

Os resultados foram processados utilizando o software MassLynx (versão 4.0). Os espectros de MS/MS foram obtidos utilizando o árgon como gás de colisão, com energias de colisão entre os 35 e os 65 eV.

#### **3.2.15. Espectrometria de massa com ionização por MALD (MALDI-MS)**

A análise de MALDI-MS, foi efectuada em modo positivo, num espectrómetro de massa Applied Biosystems 4800 ProteomicsAnalyser (Applied Biosystems, Framingham, MA, USA), com fonte de ionização por MALDI equipado com laser de azoto com radiação de emissão a 337 nm, acoplado a um analisador de tempo-de-voo (TOF/TOF) operando em modo linear.

A preparação do sistema matriz-analito foi realizada de acordo com o método da dupla camada. Este procedimento implica a preparação de uma solução saturada de CMBT (5-cloro-mercapto-benzotiazole), por dissolução em MeOH:THF:H<sub>2</sub>O (1/1/1, v/v/v). Cerca de 0.5 µL da solução foi depositada na placa e deixada secar ao ar. Entretanto, num eppendorf foram colocados 5 µL de amostra e 20 µL de solução saturada de DHB (ácido

2,5-di-hidroxi-benzóico) preparada por dissolução em AcN:TFA (0.1%), 70:30 (v/v). Sobre a camada de CMBT anteriormente aplicada na placa foi posteriormente colocado 0.3 µL de mistura de matriz:analito (DHB:amostra) que foi posteriormente seco à temperatura ambiente.

### 3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise química dos constituintes da madeira de *Paulownia elongata* / *Paulownia fortunei* foi realizada sobre a fracção entre 40-60 mesh, resultante da moagem e crivagem das estilhas da madeira. O primeiro passo foi determinar a humidade relativa desta amostra, a qual se apresentou como contendo 6.62% de humidade.

Até à obtenção das xilanas puras, a serrim da amostra teve que passar por uma série de procedimentos, entre os quais, a extracção de extractáveis solúveis em água e de extractáveis solúveis em acetona, deslenhificação com ácido peracético e por fim isolamento das xilanas com DMSO.

Com o objectivo de quantificar selectivamente compostos de baixo peso molecular com diferentes polaridades, foram realizadas extracções inicialmente em água e de seguida em acetona. Esta espécie de madeira de *Paulownia (elongata/fortunei)* apresentou percentagens relativamente elevadas de extractáveis solúveis em água (8.48% m/m) e de extractáveis solúveis em acetona (2.67% m/m).

Após efectuada a extracção destes compostos de baixo peso molecular, foi efectuado o passo de deslenhificação com ácido peracético, isto é, foi extraído conteúdo em lenhina contido nesta amostra, dando origem à holocelulose. A percentagem de holocelulose obtida foi de 58.99% (m/m). A partir da holocelulose obtida, as xilanas foram extraídas com DMSO e posteriormente isoladas por precipitação com um excesso de solução de etanol:metanol (7:2 v/v) ligeiramente acidificada com ácido fórmico.

As xilanas obtidas foram sujeitas a uma hidrólise total, e os monossacarídeos resultantes foram acetilados e reduzidos para análise de açúcares neutros, identificados sob a forma de acetatos de alditol, por GC-FID (Coimbra *et al.*, 1996).

A análise dos monossacarídeos neutros revelou que esta xilana é constituída predominantemente por xilose (Xyl) e pequenas quantidades de galactose (Gal), glucose (Glc) e manose (Man), como se apresenta na Tabela 3.1. Foi ainda detectada a presença de vestígios de ramnose (Rha) e arabinose (Ara), mas cuja percentagem se revelou ser inferior a 0.5% (Tabela 3.1).

Pela análise de ácidos urónicos, efectuada pelo método colorimétrico, foi possível verificar que as xilanas isoladas a partir de amostras de madeira de *Paulownia elongata* / *Paulownia fortunei* apresentam na sua constituição cerca de 6% (em percentagem molar) de ácidos urónicos.

**Tabela 3.1.** Composição em açúcares das amostras de xilanas de *Paulownia elongata* / *Paulownia fortunei*.

Monossacarídeos	Mol% nas xilanas
Rha	0.1
Fuc	-
Ara	0.3
Xyl	87.0
Man	3.0
Gal	1.1
Glc	2.6
MeGlcA <sup>a</sup>	6.0

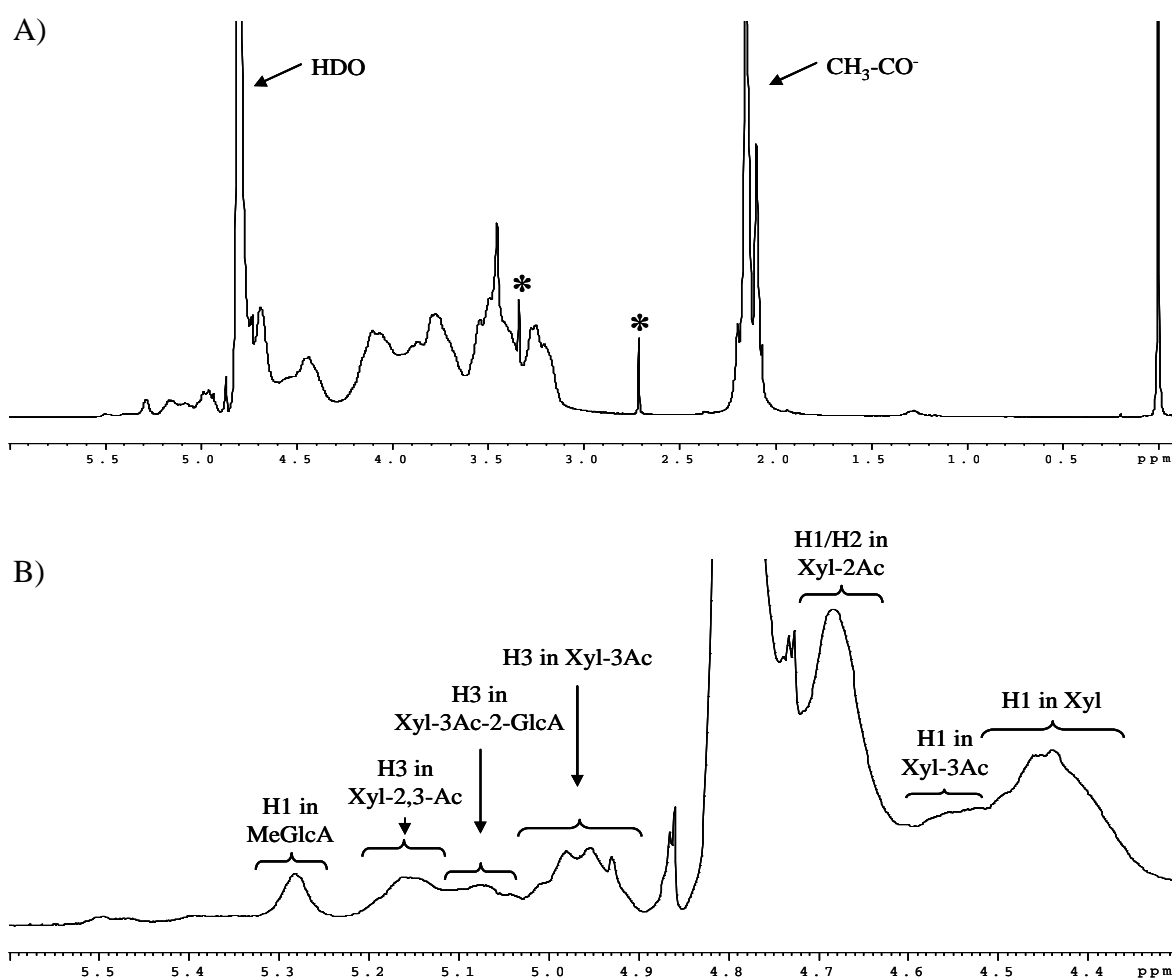
<sup>a</sup> todo o tipo de ácidos urónicos foram calculados como MeGlcA

A xilana foi também analisada por RMN. Através da análise efectuada por RMN <sup>1</sup>H, foi possível detectar a presença de um sinal a 2.15 ppm, o qual é indicador da presença de oligossacarídeos e polissacarídeos acetilados (Figura 3.3.A) (Teleman *et al.*, 2000; Teleman *et al.*, 2002; Teleman *et al.*, 2003; van Hazendonk *et al.*, 2003; Evtuguin *et al.*, 2003). Analisando a região ampliada, entre os 4.30 e os 5.60 ppm, do espectro de RMN <sup>1</sup>H (Figura 3.3.B), é possível verificar a presença de uma série de sinais característicos deste tipo de polissacarídeos, já identificados anteriormente para xilanas provenientes de outros tipos de madeira de *hardwood*. Nesta região podem observar-se dois sinais mais intensos a 4.47 ppm e 4.68 ppm. O sinal observado a 4.47 ppm, corresponde aos potrões H1 presentes nas unidades de  $\rightarrow 4$ )- $\beta$ -D-Xylp-(1 $\rightarrow$ , o que nos permite concluir acerca de existência de cadeias lineares de xilose, ligadas por ligações  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4). O sinal apresentado para 4.68



ppm foi identificado como correspondendo aos prótons H1/H2 relativos a grupos de xilose acetilados na posição 2 ( $\rightarrow 4$ )[2-*O*-Ac]- $\beta$ -D-Xylp-(1 $\rightarrow$ ) (Shatalov *et al.*, 1999; Evtuguin *et al.*, 2003).

A presença de sinais a 4.57 ppm e 4.98 ppm, dão-nos informação relativa à existência de resíduos de xilose acetilados na posição 3 ( $\rightarrow 4$ )[3-*O*-Ac]- $\beta$ -D-Xylp-(1 $\rightarrow$ ), onde o sinal a 4.57 ppm corresponde aos prótons H1 de Xyl-3Ac e o sinal a 4.98 ppm corresponde aos prótons H3 dos grupos Xyl-3Ac (Evtuguin *et al.*, 2003). Foi ainda detectado um sinal a 5.08 ppm, o qual foi atribuído à presença de resíduos de xilose acetilada nas posições 2 e 3 simultaneamente.



**Figura 3.3.** Espectro de RMN de próton (D<sub>2</sub>O, 25 °C) das xilanas da madeira de *Paulownia elongata* / *Paulownia fortunei* (A) e a região expandida correspondente aos prótons anoméricos (B). As impurezas dos solventes encontram-se sinalizadas com um asterisco (\*).

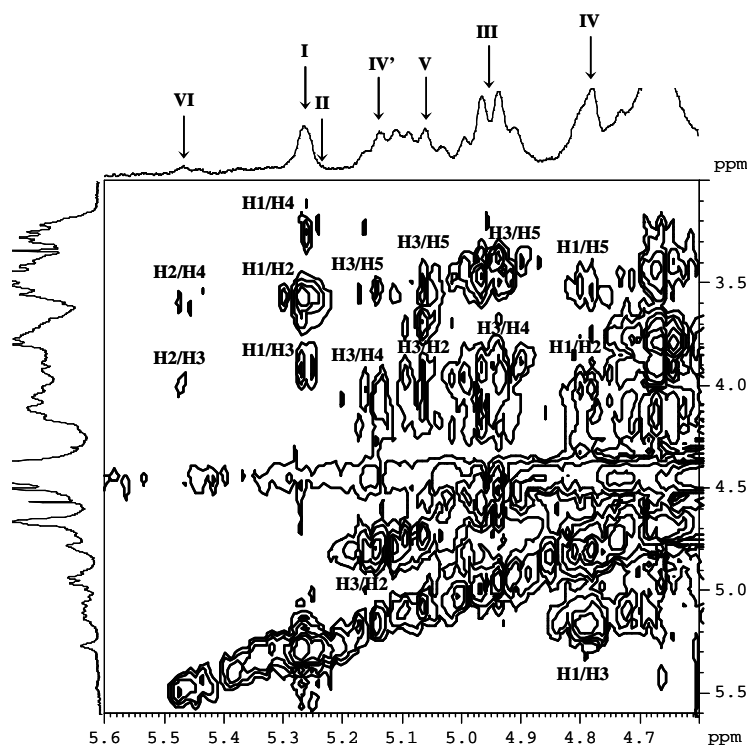
Pela análise das respectivas abundâncias relativas dos diferentes sinais (Tabela 3.2), foi possível inferir acerca da constituição da cadeia principal deste tipo de xilanas, a qual aparenta ser composta maioritariamente por resíduos de xilose, ligados por ligações  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4), apresentando-se cerca de 53% dos resíduos de xilose acetilados. Os grupos acetilo encontram-se distribuídos pelas posições 2 e/ou 3 dos resíduos de xilose, sendo que a ocupação da posição 2 é preferencial em detrimento da posição 3.

O sinal observado a 5.28 ppm, foi atribuído à presença de 4-*O*-Me- $\alpha$ -D-GlcpA-(1 $\rightarrow$ , confirmando a presença do ácido 4-*O*-metilglucurónico na composição deste heteropolissacarídeo (Evtuguin *et al.*, 2003).

**Tabela 3.2.** Abundâncias relativas dos diferentes fragmentos presentes nas unidades estruturais das xilanas de *Paulownia elongata* / *Paulownia fortunei*.

Estrutura dos fragmentos (designação)	Abundância relativa (por 100 unidades de Xylp)
$\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-Xylp-(1 $\rightarrow$ ( <b>Xyl</b> )	46
$\rightarrow$ 4)[3- <i>O</i> -Ac]- $\beta$ -D-Xylp-(1 $\rightarrow$ ( <b>Xyl-3Ac</b> )	16
$\rightarrow$ 4)[2- <i>O</i> -Ac]- $\beta$ -D-Xylp-(1 $\rightarrow$ ( <b>Xyl-2Ac</b> )	21
$\rightarrow$ 4)[3- <i>O</i> -Ac][2- <i>O</i> -Ac]- $\beta$ -D-Xylp-(1 $\rightarrow$ ( <b>Xyl-2,3Ac</b> )	7
$\rightarrow$ 4)[3- <i>O</i> -Me- $\alpha$ -D-GlcpA-(1 $\rightarrow$ 2)][3- <i>O</i> -Ac]- $\beta$ -D-Xylp-(1 $\rightarrow$ ( <b>Xyl-3Ac-2MeGlcA</b> )	5
4- <i>O</i> - Me- $\alpha$ -D-GlcpA-(1 $\rightarrow$ ( <b>MeGlcA</b> )	5

De acordo com o espectro obtido por TOCSY (Figura 3.4), foi possível assinalar ainda, a presença de GlcpA-(1 $\rightarrow$  (Figura 3.4-II) como ramificação da xilose. Foi possível identificar a presença de 4)[2-*O*-Ac]- $\beta$ -D-Manp-(1 $\rightarrow$  (Figura 3.4-VI), a qual poderá ser considerada como contaminante, dado que a xilana isolada não se encontra completamente pura. Na tabela 3.3. encontram-se sumariados os desvios químicos dos prótons atribuídos para cada uma das estruturas identificadas (I-VI).



- I – MeGlcA-(1→  
 II – GlcA-(1→  
 III – 4)[3-O-Ac]-β-D-Xylp-(1→  
 IV, IV' – 4)[3-O-Ac][2-O-Ac]-β-D-Xylp-(1→  
 V – 4)[4-O-Me-α-D-GlcA-(1→2)][3-O-Ac]-β-D-Xylp-(1→  
 VI – 4)[2-O-Ac]-β-D-Manp-(1→

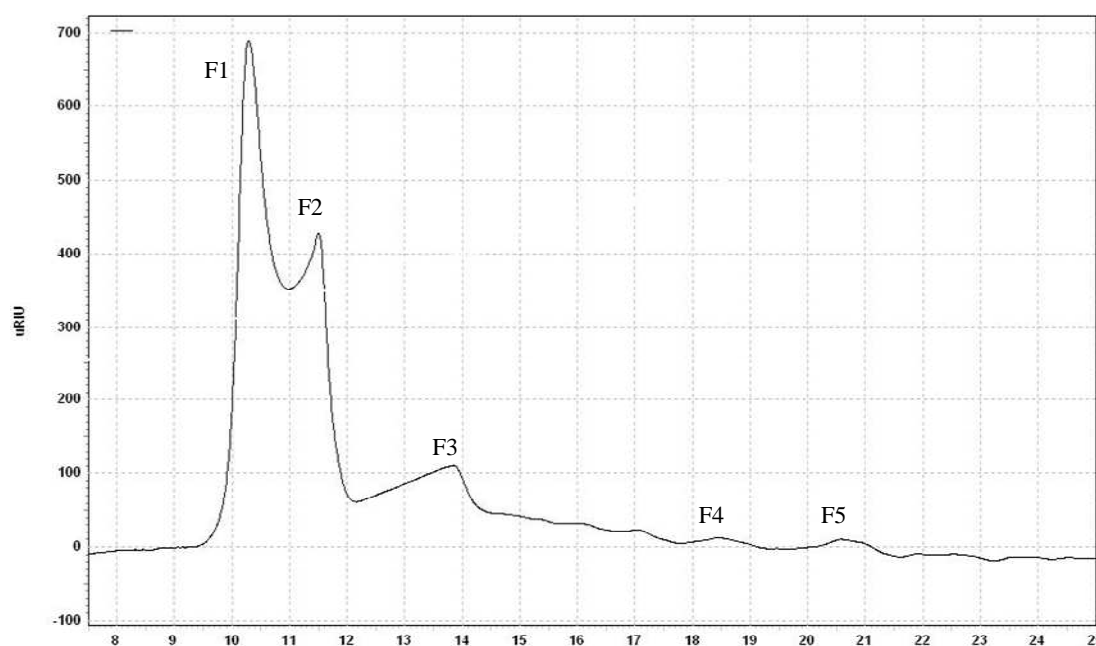
**Figura 3.4.** Espectro TOCSY (D<sub>2</sub>O, 60 °C) das xilanas da madeira de *Paulownia elongata* / *Paulownia fortunei*.

**Tabela 3.3.** Desvios químicos de próton ( $\delta$ , ppm), observados no espectro TOCSY, relativos aos fragmentos das xilanas de *Paulownia elongata* / *Paulownia fortunei*.

Unidade estrutural	Atribuições					
	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	
					ax	eq
Xyl (isol.)	4.47	3.28	3.55	3.80	3.40	4.10
Xyl (Xyl-Ac)	4.44	3.21	3.50	3.78	3.38	4.06
Xyl-3Ac	4.57	3.49	4.98	3.93	3.47	n.d.
Xyl-2Ac	4.68	4.68	3.80	3.87	3.45	n.d.
Xyl-2,3-Ac	4.80	4.82	5.16	4.06	3.54	n.d.
Xyl-3Ac-2GlcA	4.73	3.70	5.06	3.98	3.50	n.d.
MeGlcA	5.28	3.57	3.90	3.27	n.d.	n.d.
GlcA	5.24	n.d.	n.d.	3.22	n.d.	n.d.

n.d. – não detectado.

Depois de determinada a composição em monossacarídeos e, efectuada a análise por RMN de próton, para fornecer informação acerca do grau de acetilação e tipo de estruturas e ramificações presentes nesta xilana, procedeu-se então à hidrólise parcial ácida da xilana. As condições de hidrólise foram seleccionadas, de forma a obter xilo-oligossacarídeos (XOS) com massas moleculares suficientemente baixas para poderem ser analisados por espectrometria de massa, mas que retivessem as informações estruturais relevantes para permitir a caracterização da estrutura primária deste polissacarídeo, de acordo com trabalhos já anteriormente publicados (Reis *et al.*, 2005). Os XOS obtidos após esta hidrólise parcial ácida foram então separados por LEX/SEC. Neste tipo de cromatografia, o empacotamento da coluna é constituído por uma resina de troca iónica, a qual promove a separação dos oligossacarídeos baseada no princípio de exclusão molecular e nos mecanismos de troca de ligandos simultaneamente (Reis *et al.*, 2005). Desta forma tornou-se possível efectuar a separação selectiva dos XOS, em neutros e ácidos, da qual resultaram cinco fracções distintas (F1-F5) (Figura 3.5).



**Figura 3.5.** Cromatograma de eluição, LEX/SEC, dos XOS obtidos por hidrólise parcial ácida, a partir das xilanas de madeira *Paulownia elongata* / *Paulownia fortunei*.

No cromatograma é possível identificar três fracções maioritárias (F1, F2 e F3). As fracções F1 e F2 são correspondentes às fracções contendo os XOS ácidos, sendo a fracção F3 correspondente à fracção contendo os XOS neutros, mas com elevado grau de

polimerização (DP). Relativamente às fracções F4 e F5, estas correspondem à eluição de XOS neutros, de baixo peso molecular, sendo o seu DP bastante inferior ao encontrado para F3, correspondendo essencialmente à presença de monómeros, dímeros e trímeros.

Todas as fracções foram recolhidas e posteriormente analisadas por ESI-MS e ESI-MS/MS. Relativamente às fracções F1, F2 e F3, uma vez que os seus espectros de ESI-MS se apresentaram muito complexos, devido à presença de inúmeros iões de carga dupla, em resultado do elevado grau de polimerização dos XOS que estas fracções apresentam, elas foram ainda analisados por MALDI-MS.

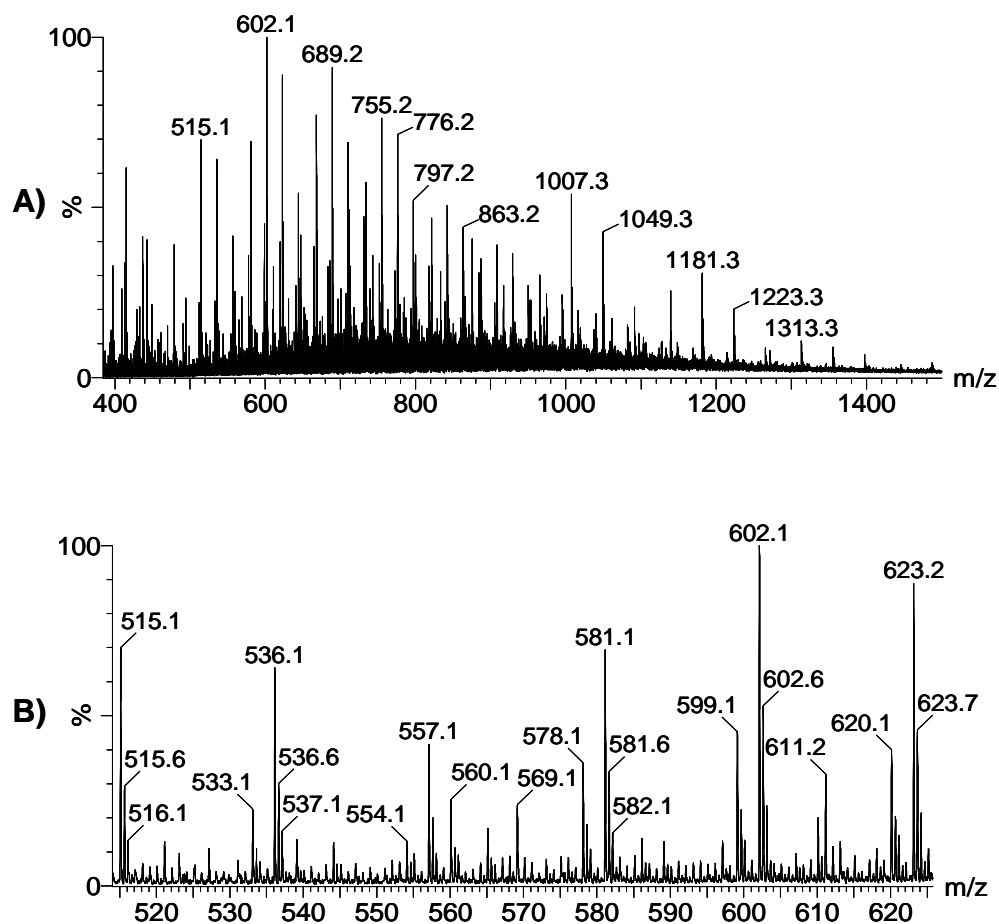
### **3.3.1. Análise por ESI-MS e MALDI-MS**

Em condições de análise de ESI-MS e MALDI-MS, os oligossacarídeos ionizam preferencialmente sob a forma de aductos de sódio,  $[M+Na]^+$ , mesmo sem adição qualquer sal de sódio (Zaia, 2004; Harvey, 2006). Desta forma, através da análise por ESI-MS e MALDI-MS efectuada para as diferentes fracções, foi possível detectar a presença de uma série de iões sob a forma de  $[M+Na]^+$ , correspondentes a XOS neutros e ácidos.

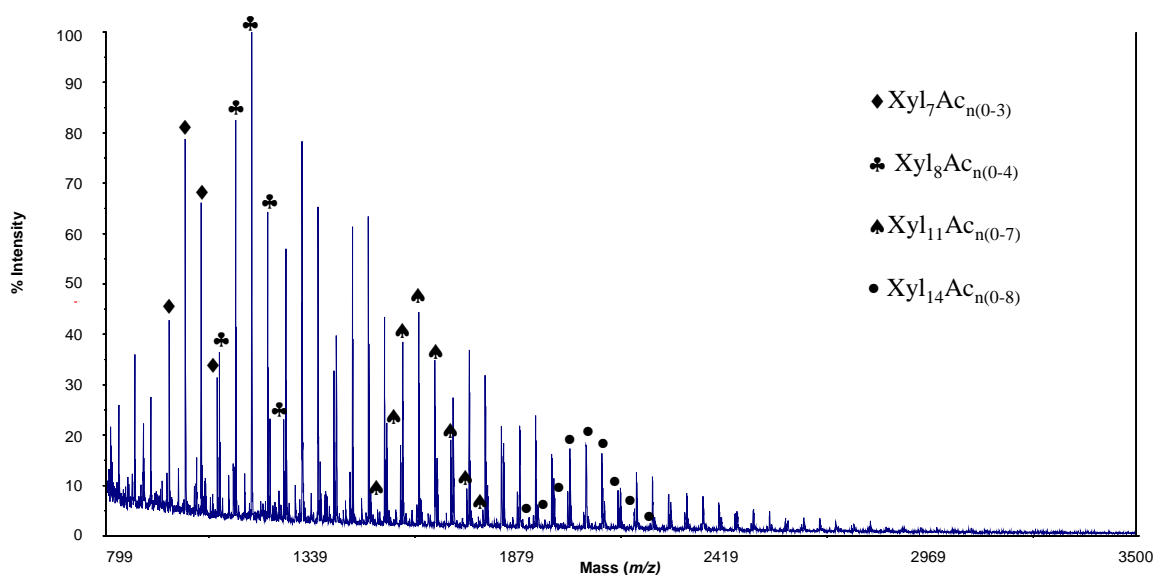
#### **Xilo-oligossacarídeos neutros**

Pela análise dos espectros de ESI-MS correspondentes às fracções de XOS neutros (F3, F4 e F5), foi possível verificar a presença de XOS de baixo peso molecular para as fracções F4 e F5, sendo que o DP mais elevado que aí foi observado foi de  $DP = 5$ . No entanto, no que se refere à fracção F3, no espectro de ESI-MS (Figura 3.6 A) verificou-se a presença de inúmeros iões de carga dupla ( $[M+2Na]^{2+}$ ). Tal observação foi confirmada pela diferença de valores entre iões adjacentes do mesmo envelope molecular, que apresentava diferenças de 0.5 como se pode ver na Figura 3.6 B, correspondente à ampliação do espectro de ESI-MS da fracção F3, na gama de valores de  $m/z$  compreendidos entre 515 e 625. Como se pode observar nesta figura os iões maioritários, para valores de  $m/z$  de 515, 536, 581, 602 e 623, todos eles apresentam iões adjacentes com diferenças de 0.5 unidades, indicando que estes se tratam de iões de carga dupla,

$[M+2Na]^{2+}$ e, que correspondem respectivamente aos XOS: Xyl<sub>7</sub>Ac<sub>1</sub>, Xyl<sub>7</sub>Ac<sub>2</sub>, Xyl<sub>8</sub>Ac<sub>1</sub>, Xyl<sub>8</sub>Ac<sub>2</sub> e Xyl<sub>8</sub>Ac<sub>3</sub>. Desta forma, para uma melhor identificação dos XOS de maior peso molecular presentes nesta fracção, foi adquirido o espectro de MALDI-MS desta fracção (Figura 3.7).



**Figura 3.6.** Espectro de ESI-MS da fracção neutra F3 de: A) espectro completo, para  $m/z$  entre 400 e 1500; B) espectro ampliado da zona de  $m/z$  entre 515 e 625.



**Figura 3.7.** Espectro de MALDI-MS da fracção neutra F3.

Da análise conjunta dos espectros de ESI-MS e MALDI-MS, foi possível identificar a presença de vários iões sob a forma de  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , os quais foram atribuídos a XOS neutros com diferentes composições, nomeadamente com diferente grau de polimerização (DP) e diferente grau de acetilação. Na tabela 3.4 encontram-se todos os iões identificados nestas fracções neutras com indicação da composição provável.

**Tabela 3.4.** Xilo-oligossacarídeos neutros identificados nos espectros de ESI-MS e MALDI-MS.

$[M+Na]^+$	Grupos n O-Acetil									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	$Xyl_mAc_n$									
$Xyl_2Ac_n$	305 <sup>a</sup>	347 <sup>a</sup>	389 <sup>a</sup>							
$Xyl_3Ac_n$		479 <sup>a</sup>	521 <sup>a</sup>	563 <sup>a</sup>						
$Xyl_4Ac_n$	569 <sup>a</sup>		653 <sup>a</sup>	695 <sup>a</sup>						
$Xyl_6Ac_n$	833	875	917	959						
$Xyl_7Ac_n$	965	1007	1049	1091						
$Xyl_8Ac_n$	1097	1139	1181	1223	1265					
$Xyl_9Ac_n$	1229	1271	1313	1355	1397	1439				
$Xyl_{10}Ac_n$	1361	1403	1445	1487	1529	1571	1613			
$Xyl_{11}Ac_n$	1493	1535	1577	1619	1661	1703	1745	1787		
$Xyl_{12}Ac_n$	1625	1667	1709	1751	1793	1835	1877	1919		
$Xyl_{13}Ac_n$	1757	1799	1841	1883	1925	1967	2009	2051	2093	
$Xyl_{14}Ac_n$	1889	1931	1973	2015	2057	2099	2141	2183	2225	
$Xyl_{15}Ac_n$		2063	2105	2147	2189	2231	2273	2315	2357	
$Xyl_{16}Ac_n$			2237	2279	2321	2363	2405	2447	2489	2531
$Xyl_{17}Ac_n$		2327	2369	2411	2453	2495	2537	2579	2621	
$Xyl_{18}Ac_n$			2501	2543	2585	2627	2669	2711	2753	2795
$Xyl_{19}Ac_n$						2759	2801	2843	2885	
$Xyl_{20}Ac_n$			2765			2891			3017	

<sup>a</sup> Iões sob a forma de  $[M+Na]^+$  observados no espectro de ESI-MS.

De acordo com os dados apresentados na tabela anterior, os iões identificados são compostos essencialmente por oligossacarídeos de Xyl, com DP variáveis, que vão desde DP 2 até DP 20. Entre estes XOS encontram-se alguns não acetilados ( $Xyl_{2-14}$ ) e outros com diferentes graus de acetilação, dependendo do seu DP, sendo que o grau de acetilação pode variar entre 1 e 9.

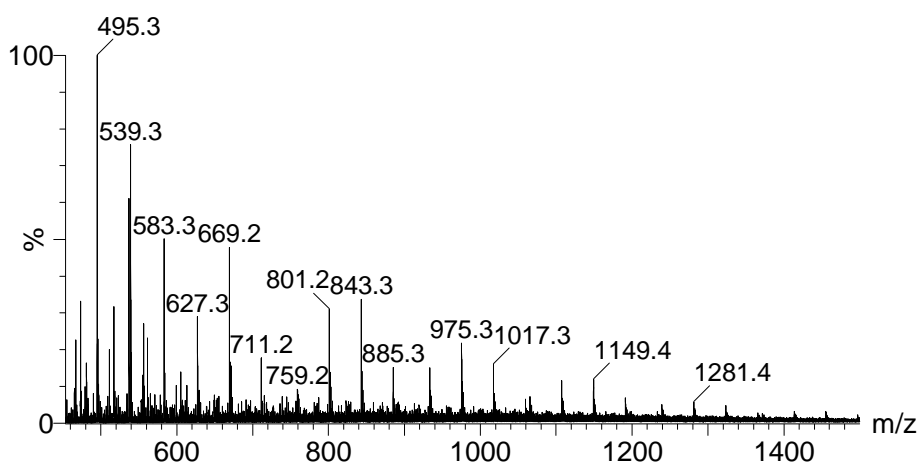
Pela análise das abundâncias relativas dos diferentes iões correspondentes a XOS neutros com o mesmo DP, por exemplo  $Xyl_8Ac_{n(0-4)}$ , é possível verificar que o ião mais abundante corresponde a  $Xyl_8Ac_2$ , o que nos leva a crer que em média existe um grupo acetilo por cada 4 unidades de Xyl. Tal facto foi também observado para as restantes séries,  $Xyl_mAc_n$ , tal como se pode ver, por exemplo para  $Xyl_{11}Ac_3$  e  $Xyl_{12}Ac_3$ , os quais



correspondem aos iões mais abundantes das respectivas séries ( $\text{Xyl}_{11}\text{Ac}_{n(0-7)}$  e  $\text{Xyl}_{12}\text{Ac}_{n(0-7)}$ ).

### Xilo-oligossacarídeos ácidos

Para as fracções ácidas F1 e F2, foram inicialmente adquiridos espectros de ESI-MS, através dos quais se verificou que estas fracções eram constituídas por XOS ácidos. Na Figura 3.8 encontra-se representado o espectro de ESI-MS correspondente à fracção F2, no qual é possível detectar a presença de uma série de iões de estrutura do tipo  $\text{Xyl}_m\text{Ac}_n\text{MeGlcA}$ . Esses iões foram identificados para valores de  $m/z$  de 495, 537, 627, 669, 711, 759, 801, 843, 885, 933, 975, 1017, 1065, 1107, 1149, 1191, 1239, 1281 e 1323.

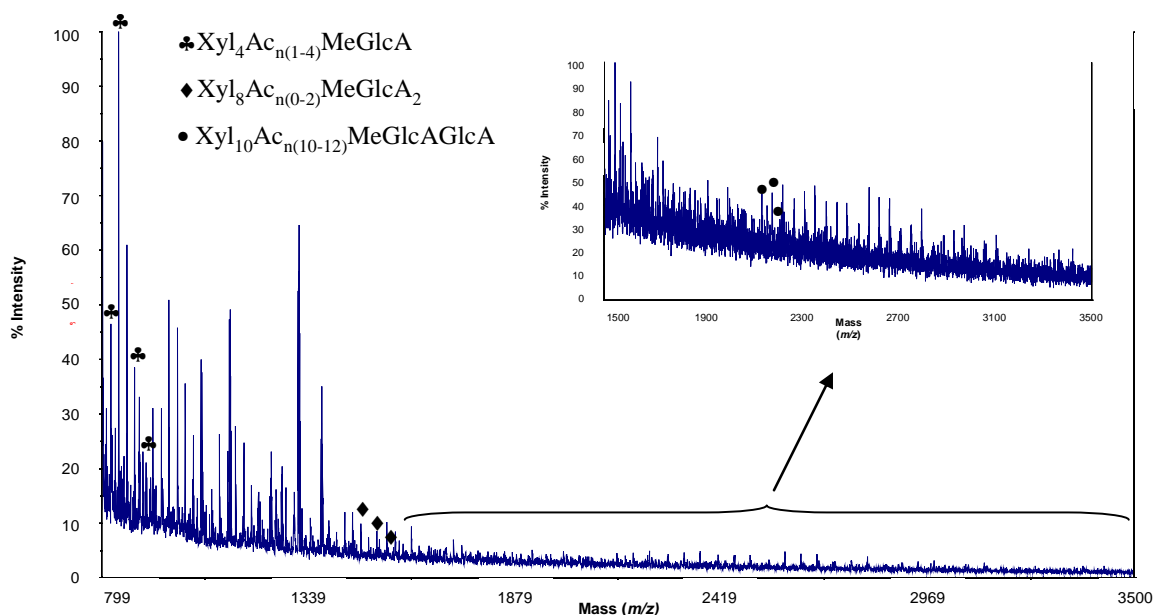


**Figura 3.8.** Espectro de ESI-MS obtido para a fracção ácida F2.

É possível verificar em vários casos a diferença de 42 Da entre picos adjacentes, a qual corresponde à presença de grupos acetilo, isto é por exemplo para os iões de  $m/z$  801 e 843, atribuídos a  $\text{Xyl}_4\text{Ac}_1\text{MeGlcA}$  e  $\text{Xyl}_4\text{Ac}_2\text{MeGlcA}$  respectivamente.

Desta forma, através da análise dos espectros de ESI-MS foi possível identificar a presença de uma série correspondente à presença de XOS com um resíduo de ácido 4-*O*-metil-glucurónico (MeGlcA), os quais poderão estar acetilados, e que podem ser representados por  $\text{Xyl}_m\text{Ac}_n\text{MeGlcA}$ . Esta série foi também observada nos espectros de MALDI-MS das fracções F1 e F2 (Tabela 3.5), podendo ainda observar nestes espectros, XOS desta série com maior DP. No entanto, a análise dos espectros de MALDI-MS

(Figura 3.9) revelou ainda a presença de duas outras séries distintas, as quais correspondem a XOS com dois resíduos de ácido 4-*O*-metil-glucurónico (MeGlcA) (Tabela 3.6) (**Xyl<sub>m</sub>Ac<sub>n</sub>MeGlcA<sub>2</sub>**) e com um resíduo de ácido 4-*O*-metil-glucurónico (MeGlcA) e um resíduo de ácido glucurónico (GlcA) (Tabela 3.7) (**Xyl<sub>m</sub>Ac<sub>n</sub>MeGlcAGlcA**).



**Figura 3.9.** Espectro de MALDI-MS da fracção ácida F2.

Da análise dos iões identificados como sendo XOS do tipo **Xyl<sub>m</sub>Ac<sub>n</sub>MeGlcA**, pode-se verificar que o seu DP varia entre 1 e 11, apresentando diferentes graus de acetilação consoante o seu DP. No entanto, apesar de se poder verificar a presença de XOS com acetilação na proporção de 1:1 (1 grupo Ac : 1 Xyl), o grau de acetilação mais abundante corresponde essencialmente à proporção de 1:2 (1 Ac : 2 Xyl). Desta forma pode-se verificar que o grau de acetilação em fragmentos de XOS ácidos é superior ao encontrado em fragmentos de XOS neutros para a qual foi observada uma proporção preferencial de 1 Ac por cada 4 resíduos de Xyl.

**Tabela 3.5.** Xilo-oligossacarídeos ácidos identificados nos espectros de ESI-MS e MALDI-MS, os quais apresentam na sua constituição um resíduo de MeGlcA.

[M+Na] <sup>+</sup>	Grupos n O-Acetil							
	0	1	2	3	4	5	6	7
Xyl <sub>m</sub> Ac <sub>n</sub> MeGlcA								
Xyl <sub>1</sub> Ac <sub>n</sub> MeGlcA	363 <sup>a</sup>							
Xyl <sub>2</sub> Ac <sub>n</sub> MeGlcA	495 <sup>a</sup>	537 <sup>a</sup>						
Xyl <sub>3</sub> Ac <sub>n</sub> MeGlcA	627 <sup>a</sup>	669 <sup>a</sup>	711 <sup>a</sup>					
Xyl <sub>4</sub> Ac <sub>n</sub> MeGlcA	759 <sup>a</sup>	801 <sup>a'</sup>	843 <sup>a'</sup>	885 <sup>a'</sup>	927			
Xyl <sub>5</sub> Ac <sub>n</sub> MeGlcA		933 <sup>a'</sup>	975 <sup>a'</sup>	1017 <sup>a'</sup>	1059			
Xyl <sub>6</sub> Ac <sub>n</sub> MeGlcA		1065 <sup>a'</sup>	1107 <sup>a'</sup>	1149 <sup>a'</sup>	1191 <sup>a'</sup>	1233		1317
Xyl <sub>7</sub> Ac <sub>n</sub> MeGlcA		1197	1239 <sup>a'</sup>	1281 <sup>a'</sup>	1323 <sup>a'</sup>	1365		
Xyl <sub>8</sub> Ac <sub>n</sub> MeGlcA		1329	1371	1413	1455	1497		
Xyl <sub>9</sub> Ac <sub>n</sub> MeGlcA			1503	1545	1587	1629		1713
Xyl <sub>10</sub> Ac <sub>n</sub> MeGlcA				1677	1719	1761	1803	
Xyl <sub>11</sub> Ac <sub>n</sub> MeGlcA			1767	1809	1851	1893	1935	1977

<sup>a</sup> Iões sob a forma de [M+Na]<sup>+</sup> observados no espectro de ESI-MS; <sup>a'</sup> Iões sob a forma de [M+Na]<sup>+</sup> observados em ambos os espectros (ESI-MS e MALDI-MS).

A outra série identificada nos espectros de MALDI-MS das fracções F1 e F2 de XOS ácidos, apresenta na sua constituição dois resíduos de MeGlcA, ou seja, obedecem à fórmula geral **Xyl<sub>m</sub>Ac<sub>n</sub>MeGlcA<sub>2</sub>**. Esta série demonstra a presença de XOS ácidos com DP entre 3 e 12, sendo que o seu grau de acetilação se apresenta inferior ao encontrado para a série anterior, tendo no máximo 1 grupo Ac por cada 3 resíduos de xilose. No entanto, a abundância relativa dos iões identificados para esta série, é muito inferior à apresentada para os iões da série anteriormente referida.

**Tabela 3.6.** Xilo-oligossacarídeos ácidos identificados nos espectros MALDI-MS, os quais apresentam na sua constituição dois resíduos de MeGlcA.

[M+Na] <sup>+</sup>	Grupos n O-Acetil				
	0	1	2	3	4
Xyl <sub>m</sub> Ac <sub>n</sub> MeGlcA <sub>2</sub>					
Xyl <sub>5</sub> Ac <sub>n</sub> MeGlcA <sub>2</sub>				1207	
Xyl <sub>6</sub> Ac <sub>n</sub> MeGlcA <sub>2</sub>	1213	1255			
Xyl <sub>7</sub> Ac <sub>n</sub> MeGlcA <sub>2</sub>	1345			1471	
Xyl <sub>8</sub> Ac <sub>n</sub> MeGlcA <sub>2</sub>	1477	1519	1561		
Xyl <sub>9</sub> Ac <sub>n</sub> MeGlcA <sub>2</sub>	1609	1651	1693		
Xyl <sub>10</sub> Ac <sub>n</sub> MeGlcA <sub>2</sub>	1741	1783	1825	1867	
Xyl <sub>11</sub> Ac <sub>n</sub> MeGlcA <sub>2</sub>		1915	1957	1999	
Xyl <sub>12</sub> Ac <sub>n</sub> MeGlcA <sub>2</sub>	2005	2047	2089		

Adicionalmente, foi detectada a presença de outra série de XOS ácidos, cujos iões identificados sugerem a presença de um resíduo de MeGlcA e um resíduo de GlcA, no mesmo XOS, obedecendo à estrutura geral **Xyl<sub>m</sub>Ac<sub>n</sub>MeGlcAGlcA**. Esta série foi identificada para graus de polimerização bastante mais elevados, estando o DP compreendido entre 6 e 20. Verifica-se ainda, que o grau de acetilação também é elevado, encontrando-se essencialmente na proporção de 1:1 (1 Ac por cada unidade de Xyl). À semelhança do que foi descrito para a série anterior, os iões identificados para esta série apresentam abundâncias relativas muito baixa.

**Tabela 3.7.** Xilo-oligossacarídeos ácidos identificados nos espectros MALDI-MS, os quais apresentam na sua constituição um resíduo de MeGlcA e um resíduo de GlcA.

[M+Na] <sup>+</sup>	Grupos n O-Acetil							
	9	10	11	12	13	14	16	17
Xyl <sub>m</sub> Ac <sub>n</sub> MeGlcAGlcA								
Xyl <sub>6</sub> Ac <sub>n</sub> MeGlcAGlcA	1577			1703				
Xyl <sub>7</sub> Ac <sub>n</sub> MeGlcAGlcA								
Xyl <sub>8</sub> Ac <sub>n</sub> MeGlcAGlcA			1925					
Xyl <sub>9</sub> Ac <sub>n</sub> MeGlcAGlcA	1973	2015						
Xyl <sub>10</sub> Ac <sub>n</sub> MeGlcAGlcA		2147	2189	2231				
Xyl <sub>11</sub> Ac <sub>n</sub> MeGlcAGlcA	2237	2279	2321	2363	2405			
Xyl <sub>12</sub> Ac <sub>n</sub> MeGlcAGlcA		2411	2453	2495	2537			
Xyl <sub>13</sub> Ac <sub>n</sub> MeGlcAGlcA	2501	2543	2585	2627	2669	2711		
Xyl <sub>14</sub> Ac <sub>n</sub> MeGlcAGlcA		2675	2717	2759	2801			
Xyl <sub>15</sub> Ac <sub>n</sub> MeGlcAGlcA				2891		2975	3059	
Xyl <sub>16</sub> Ac <sub>n</sub> MeGlcAGlcA				3023	3065	3107		
Xyl <sub>17</sub> Ac <sub>n</sub> MeGlcAGlcA			3113		3197			3065
Xyl <sub>18</sub> Ac <sub>n</sub> MeGlcAGlcA					3329			
Xyl <sub>19</sub> Ac <sub>n</sub> MeGlcAGlcA								
Xyl <sub>20</sub> Ac <sub>n</sub> MeGlcAGlcA						3635		

### 3.3.2. Análise por ESI-MS/MS

De forma a confirmar as estruturas propostas para os diferentes oligossacarídeos, realizou-se o estudo da fragmentação em ESI-MS/MS dos iões observados nos espectros de ESI-MS das diferentes fracções.

#### Xilo-oligossacarídeos neutros

Nos espectros de ESI-MS das fracções neutras, os iões correspondentes aos xilo-oligossacarídeos foram identificados sob a forma de aductos de sódio, [M+Na]<sup>+</sup>, com predominância para os oligossacarídeos de xilose (Xyl<sub>n</sub>) e xilose acetilada (Xyl<sub>m</sub>Ac<sub>n</sub>). Foram identificados os iões para *m/z* 305, 347, 389, 437, 479, 521, 563, 653, 695 e 785. Os

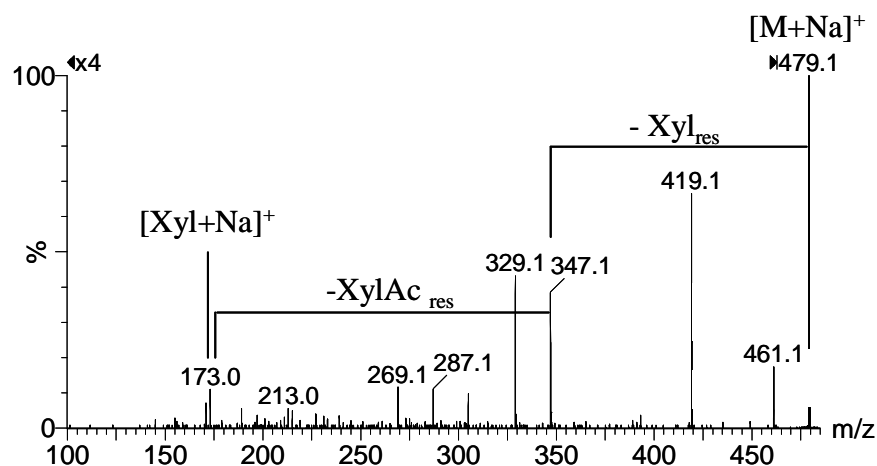
iões 305, 437 e 569, os quais correspondem à série de XOS constituídos por xiloses não acetiladas, isto é, fazem parte da série  $\text{Xyl}_n$ . Os restantes iões identificados correspondem a XOS acetilados ( $\text{Xyl}_n\text{Ac}_m$ ), fazendo eles parte de três séries distintas, com grau de acetilação entre 1 e 3. Os iões de  $m/z$  347 e 479, foram atribuídos a  $\text{Xyl}_{n(2-3)}\text{-Ac}_1$ ; os iões de  $m/z$  389, 521, 653 e 785, à série  $\text{Xyl}_{n(3-5)}\text{-Ac}_2$  e por fim os iões de  $m/z$  563, 695, à série  $\text{Xyl}_{n(3-4)}\text{-Ac}_3$ .

Os espectros de MS/MS dos iões de  $m/z$  347, 479, 389, 521, 653 e 695 obtidos foram semelhantes aos apresentados em estudos previamente publicados de XOS (Reis *et al.*, 2005), o que confirma a sua composição. Verificamos igualmente que os grupos acetilo podem estar ligados a diferentes resíduos de xilose e que para graus de acetilação maiores que 1 podemos observar a presença de resíduos de xilose ligados a 1 e/ou 2 grupos acetilo, tal como se verificou anteriormente (Reis *et al.*, 2005).

Em seguida serão apresentados espectros de ESI-MS/MS obtidos para alguns dos iões identificados, de forma a confirmar a sua caracterização estrutural.

#### $m/z$ 479

Para o valor de  $m/z$  de 479 foi proposta a estrutura  $\text{Xyl}_3\text{Ac}$ , que pode ser comprovada pela análise do espectro de ESI-MS/MS obtido para este ião (Figura 3.10).



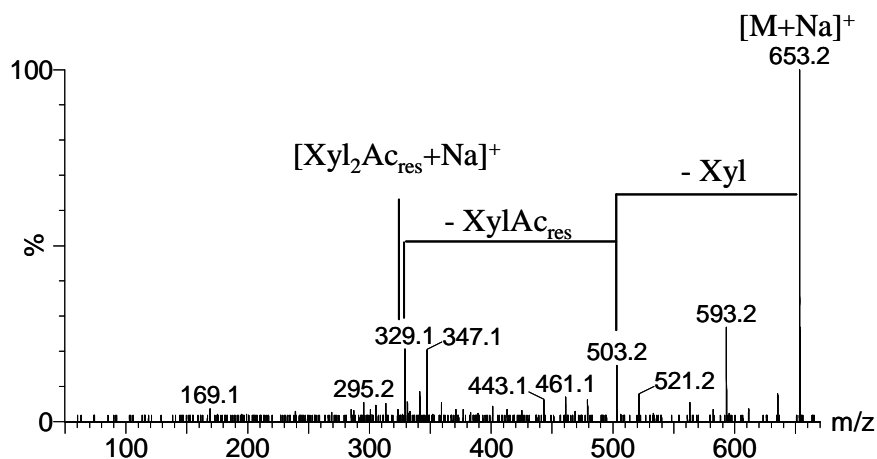
**Figura 3.10.** Espectro de ESI-MS/MS do ião de  $m/z$  479 obtido num ESI-Q-TOF.

No espectro de ESI-MS/MS, verifica-se inicialmente a perda de 132 Da a partir do ião precursor, correspondente à perda de um resíduo de Xyl, com formação do ião de  $m/z$

347. A partir deste verifica-se uma perda de 174 Da, a qual corresponde à perda de um resíduo de Xyl com um grupo acetilo, com formação do ião para  $m/z$  173, corresponde ao aducto de sódio do terminal redutor,  $[\text{Xyl}+\text{Na}]^+$ . É possível visualizar ainda a presença do ião para  $m/z$  329, o qual corresponde à perda de 150 Da a partir do ião precursor e, que pode ser explicado pela perda de uma Xyl a partir do terminal redutor (Reinhold *et al.*, 1996). Sendo então a estrutura deste XOS correspondente a **Xyl-XylAc-Xyl**. No entanto, a presença do ião de  $m/z$  305 (- XylAc<sub>res</sub>) e do ião de  $m/z$  287 (-XylAc) indica que existem outros isómeros, XylAc-Xyl-Xyl e Xyl-Xyl-XylAc, mas com abundâncias relativas menores.

### $m/z$ 653

O ião de  $m/z$  653 foi identificado como **Xyl<sub>4</sub>Ac<sub>2</sub>**. Este ião apresenta um padrão de fragmentação muito semelhante ao encontrado para o ião de  $m/z$  479. Através da análise dos fragmentos presentes no espectro de MS/MS apresentado na Figura 3.11, verifica-se a presença de duas vias de fragmentação distintas, uma via apresenta a fragmentação a partir do terminal redutor e a outra via apresenta a fragmentação a partir do terminal não redutor.



**Figura 3.11.** Espectro de ESI-MS/MS do ião de  $m/z$  653 obtido num ESI-Q-TOF.

Analisando a via que fragmenta a partir do terminal redutor, verifica-se uma perda inicial de um resíduo de Xyl a partir do terminal redutor (-150 Da), com formação do ião de  $m/z$  503. Posteriormente verifica-se a perda de 174 Da, que tal como descrito anteriormente, corresponde à perda de um resíduo de Xyl com um grupo acetilo, dando

origem à formação do ião de  $m/z$  329, o qual corresponde ao aducto de sódio do resíduo  $\text{Xyl}_2\text{Ac}$  ( $[\text{Xyl}_2\text{Ac}_{\text{res}}+\text{Na}]^+$ ). Assim a estrutura deste oligossacarídeo é **Xyl-XylAc-XylAc-Xyl**. No entanto, a presença do ião de  $m/z$  461, por perda de XylAc a partir do terminal redutor, indica a presença de um isómero de estrutura **Xyl-XylAc-Xyl-XylAc**, mas o qual se apresenta com uma menor abundância relativa.

A via de fragmentação apresentada a partir do terminal não redutor, é seguida através da formação do ião de  $m/z$  521, por perda de um resíduo de Xyl (-132 Da), seguida da formação do ião de  $m/z$  347, por perda de um resíduo de XylAc (-174 Da), o qual corresponde ao aducto de sódio de  $[\text{Xyl}_2\text{Ac}+\text{Na}]^+$ . Sendo então a estrutura deste XOS dada por: **Xyl-XylAc-XylAc-Xyl**.

### Xilo-oligossacarídeos ácidos

Nos espectros de ESI-MS das fracções ácidas, os iões correspondentes aos xilo-oligossacarídeos ácidos também foram identificados sob a forma de aductos de sódio,  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , com predominância dos oligossacarídeos de xilose com um grupo de ácido 4-*O*-metil-glucurónico ( $\text{Xyl}_m\text{MeGlcA}$ ), e dos oligossacarídeos de xilose acetilada com um ácido 4-*O*-metil-glucurónico ( $\text{Xyl}_m\text{Ac}_n\text{MeGlcA}$ ). Foram identificados os iões de  $m/z$  363, 495, 627 e 759, como sendo XOS ácidos não acetilados ( $\text{Xyl}_m\text{MeGlcA}$ ), bem como os iões de  $m/z$  537, 669, 711, 801, 843, 885, 933, 975, 1017, 1065, 1107, 1149, 1191, 1239, 1281 e 1323, correspondentes aos XOS ácidos acetilados e com um resíduo MeGlcA ( $\text{Xyl}_m\text{Ac}_n\text{MeGlcA}$ ). Foram obtidos os espectros de ESI-MS/MS de todos os iões identificados, de forma a confirmar a sua composição e estrutura.

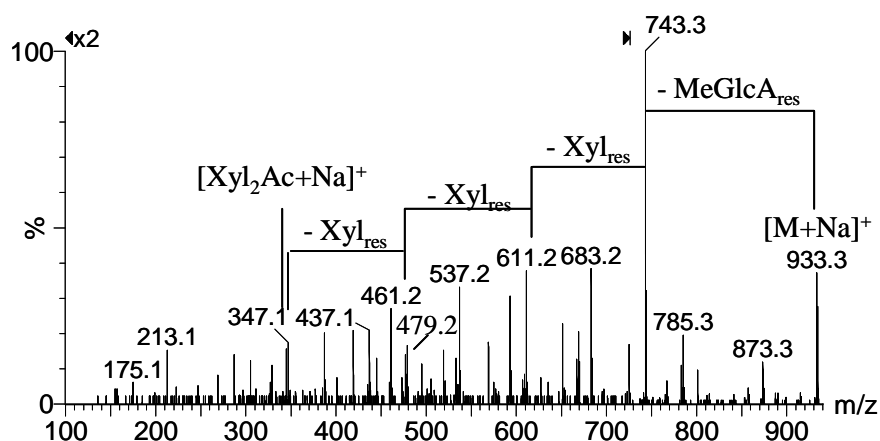
Algumas destas estruturas foram já caracterizadas anteriormente por espectrometria de massa tandem, como é o caso dos iões para  $m/z$  537, 669, 843 e 885 (Reis *et al.*, 2005). Os espectros obtidos neste trabalho para estes mesmos iões revelaram ser iguais aos já descritos por Reis *et al.* (2005). Como tal, a título de exemplo será apresentado o espectro de ESI-MS/MS obtido para o ião de  $m/z$  933, identificado no espectro de ESI-MS como  $\text{Xyl}_5\text{AcMeGlcA}$ , de forma a demonstrar a sua caracterização estrutural.



***m/z* 933**

Na Figura 3.12 encontra-se o espectro de ESI-MS/MS relativo ao ião de *m/z* 933, o qual foi identificado como **Xyl<sub>5</sub>AcMeGlcA**.

No espectro de ESI-MS/MS verifica-se que a fragmentação deste XOS é iniciada pela perda de um resíduo de MeGlcA a partir do ião precursor, com formação do ião de *m/z* 743. A partir daqui verifica-se a perda de três resíduos de Xyl consecutivos, primeiro para *m/z* 611, depois para *m/z* 479 e por fim para *m/z* 347, o qual corresponde ao aducto de sódio [Xyl<sub>2</sub>Ac+Na]<sup>+</sup>. Desta forma, a estrutura proposta para este XOS é **(MeGlcA)-Xyl-Xyl-Xyl-XylAc-Xyl**. Uma vez que o MeGlcA se apresenta como ramificação, aparece como sendo a primeira perda no espectro de fragmentação, no entanto não nos é possível afirmar qual a sua localização na cadeia.



**Figura 3.12.** Espectro de ESI-MS/MS do ião de *m/z* 933 obtido num ESI-Q-TOF.

### 3.4. CONCLUSÃO

Xilanas da madeira de *Paulowia elongata* / *Paulownia fortunei*, isoladas a partir da madeira e caracterizadas por análise de açúcares, <sup>1</sup>H RMN e espectrometria de massa são constituídas por uma cadeia principal (1-4)-β-D-xilopiranosse parcialmente acetiladas e ramificadas com MeGlcA. XOS obtidos por hidrólise parcial ácida da xilana, e fraccionados por LEX-SEC, foram caracterizados por ESI-MS, MS/MS e MALDI-MS.

Assim, foram identificadas séries de XOS neutros, acetilados e não acetilados com diferentes graus de acetilação ( $\text{Xyl}_{12-20}\text{Ac}_{0-9}$ ), e XOS ácidos, correspondentes a três séries distintas que se podem representar por:  $\text{Xyl}_{1-11}\text{Ac}_{0-7}\text{MeGlcA}$ ;  $\text{Xyl}_{5-12}\text{Ac}_{0-3}\text{MeGlcA}_2$  e  $\text{Xyl}_{6-20}\text{Ac}_{9-17}\text{MeGlcAGlcA}$ . Desta forma, a identificação de XOS neutros com elevado DP, tais como  $\text{Xyl}_{20}\text{Ac}_8$ , leva-nos a sugerir que os resíduos ácidos se apresentam distribuídos pela cadeia de xilana, de uma forma irregular, tal como já foi descrito para xilanas extraídas de outras madeiras de *hardwood* (Jacobs *et al.*, 2001). Ao contrário da xilana da madeira de *Eucalyptus globulus*, não foram encontrados resíduos de hexoses como componentes destes polissacarídeos. Destaca-se a presença de resíduos de ácido glucurónico confirmado por RMN e espectrometria de massa, resíduo este ausente na xilana de *Eucalyptus globulus*.



## **CAPÍTULO 4**

# **CONCLUSÕES**



Este trabalho permitiu obter informação detalhada sobre a estrutura primária de dois heteropolissacarídeos, gelanas e xilanas, utilizando Espectrometria de Massa (MS) com métodos de ionização por electrospray (ESI) e ionização por desorção por laser assistida por matriz (MALDI).

Neste trabalho foi efectuada a caracterização de duas gelanas, uma gelana comercial e uma gelana modificada *JB3*, através da análise de espectros de ESI MS e espectrometria de massa tandem (ESI-MS/MS e MS<sup>n</sup>) de oligossacarídeos obtidos após hidrólise parcial ácida. Tal análise permitiu identificar em ambas as gelanas, a unidade estrutural típica destes polímeros, a qual é constituída por dois resíduos de Glc, um resíduo de GlcA e um resíduo de Rha, com a sequência GlcGlcAGlcRha. No entanto, verificaram-se também diferenças estruturais entre ambas as gelanas, essencialmente no que diz respeito a grupos substituintes. Assim, verificou-se a presença de grupos glicerato apenas na constituição da gelana modificada, e ausência de grupos acetilo em ambas as gelanas. A análise por ESI-MS/MS e ESI-MS<sup>n</sup> permitiu ainda identificar a possível presença de ramificações e de sequências distintas das descritas anteriormente para estes heteropolissacarídeos.

Xilanas da madeira de *Paulowia elongata* / *Paulownia fortunei* foram isoladas a partir desta madeira e caracterizadas por análise de açúcares, <sup>1</sup>H RMN e espectrometria de massa. Os resultados obtidos permitiram concluir que estas xilanas são constituídas por uma cadeia principal (1-4)-β-D-xilopirranose, que se encontra parcialmente acetilada e que tem como ramificação resíduos de ácido 4-*O*-metilglucurónico, e minoritariamente, ácido glucurónico. A análise dos XOS obtidos por hidrólise parcial ácida da xilana, fraccionados por LEX-SEC e caracterizados por ESI-MS, ESI-MS/MS e MALDI-MS, permitiu identificar séries de XOS neutros, acetilados e não acetilados com diferentes graus de acetilação (Xyl<sub>2-20</sub>Ac<sub>0-9</sub>), e XOS ácidos, correspondentes a três séries distintas que se podem representar por: Xyl<sub>1-11</sub>Ac<sub>0-7</sub>MeGlcA; Xyl<sub>5-12</sub>Ac<sub>0-3</sub>MeGlcA<sub>2</sub> e Xyl<sub>6-20</sub>Ac<sub>9-17</sub>MeGlcAGlcA. A identificação de XOS neutros com elevado DP, tais como Xyl<sub>20</sub>Ac<sub>8</sub>, leva-nos a sugerir que os resíduos ácidos se apresentam distribuídos pela cadeia de xilana, de uma forma irregular. O grau de acetilação encontrado foi variável, tendo-se verificado um maior grau de acetilação nos XOS ácidos (1 Ac para 1 Xyl) quando em comparação com os XOS neutros (1 Ac para 4 Xyl). No entanto, considerando o conjunto, a razão entre o número de grupos acetilo e de resíduos de xilana, apresenta em média, um índice de

acetilação de 1 grupo acetilo por cada 2 resíduos de xilose, e que é confirmado por dados de RMN.

Mais uma vez a espectrometria de massa revelou ser de extrema importância para a identificação e caracterização estrutural de oligossacarídeos.

## **CAPÍTULO 5**

# **PERSPECTIVAS DE TRABALHO FUTURO**





Dados os resultados promissores deste trabalho, pretende-se o alargamento e continuação da análise de oligossacarídeos por espectrometria de massa.

Por um lado, a análise e caracterização estrutural de outras gelanas modificadas, deve ser explorada, tendo como finalidade ajudar na compreensão da relação entre a estrutura do exopolissacarídeo e suas propriedades reológicas, de modo a otimizar as suas aplicações industriais.

Por outro lado, a identificação e caracterização das modificações estruturais das xilanas, que ocorrem durante todo o processamento no fabrico da pasta de papel, é um tópico que será explorado no futuro, como continuação deste trabalho e para o qual, os resultados apresentados nesta dissertação servirão de base para a realização de trabalho futuro.



## **CAPÍTULO 6**

# **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**



- Antonopoulos, A., Favetta, P., Helbert, W. and Lafosse, M. (2004). Isolation of  $\kappa$ -carrageenenes oligosaccharides using ion-pair liquid chromatography – characterisation by electrospray ionisation mass spectrometry in positive-ion mode. *Carbohydrate Research*, **339**, 1301-1309.
- Ardrey, R. E. (2003) Liquid Chromatography – Mass Spectrometry: an Introduction, John Wiley & Sons, Ltd, England.
- Ashcroft, A.E. (1997). Ionization Methods in Organic Mass Spectrometry. *The Royal Society of Chemistry*, Cambridge.
- Banik, R.M., Kanari, B. and Upadhyay (2000). Exopolysaccharide of gellan family: prospects and potencial. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, **16**, 407-414.
- Bahr, U., Pfenninger, A., Karas, M. (1997) High sensitivity analysis of neutral underivatised oligosaccharides by nanoelectrospray mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, **69**, 4530- 4535.
- Barnes, C.A.S. and Lim, A. (2007). Applications of mass spectrometry for the structural characterization of recombinant protein pharmaceuticals. *Mass Spectrometry Reviews*, **26**, 370-388.
- Bergmann, B.A. (1998-9. Propagation method influences first year field survival and growyh of *Paulownia*, *New Forests*, **16**, 251-264.
- Blumenkrantz, N. and Ashoe-Hansen, G. (1973). New method for quantitative determination of uronic acids. *Analytical Biochemistry*, **54**, 484-489.
- Brüll, L., Huisman, M., Schols, Voragen, F., Critchley, G., Thomas-Oates, J. and Haverkamp, J. (1998). Rapid molecular mass structural determination of plant cell wall-derived oligosaccharides using of-line hight-performance anion exchange chromatography/mass soectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, **33**, 713-720.
- Caparrós, S., Díaz, M.J., Ariza, J., López, F. And Jiménez, L. (2007a). New perspectives for *Paulownia fortunei* L. Valorisation of the autohydrolysis and pulping processes. *Bioresource Technology*, doi :10.1016/j.biortech.2007.01.028.
- Caparrós, S., Ariza, J., Garrote, G. López, F. and Díaz, M.J. (2007b). Optimization of *Paulownia Fortunei* L. Autohydrolysis-organosolv pulping as a source of xylooligomers and cellulose pulp. *Industrial Engineering Chemistry Research*, **46**, 623-631.

- Cech, N.B. & Enke, C.G. (2001). Practical implications of some recent studies in electrospray ionization fundamentals. *Mass Spectrometry Reviews*, **20**, 362-387.
- Chai, W., Piskarev, V. and Lawson, A.M. (2001). Negative-ion electrospray mass spectrometry of neutral underivatized oligosaccharides. *Analytical Chemistry*, **73**, 651-657.
- Chai, W., Lawson, A.M., Piskarev, V. (2002). Branching pattern and sequence analysis of underivatized oligosaccharides by combined MS/MS of singly and doubly charged molecular ions in negative-ion electrospray mass spectrometry. *Journal American Society Mass Spectrometry*, **13**, 670-679.
- Chandrasekaran, R. Radha, A. and Thailambal, V.G. (1992). Role of potassium ions, acetyl and L-gliceryl groups in native gellan double helix: an X-ray study. *Carbohydrate Research*, **224**, 1-17.
- Chandrasekaran, R. and Radha, A. (1995), Molecular architectures and functional properties of gellan gum and related polysaccharides. *Trends in Food Science & Technology*, **6**, 143-148.
- Chapman, J.R. (1993). Practical Organic Mass Spectrometry – a guide for chemical and biochemical analysis. 2<sup>nd</sup> Edition. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, England.
- Chernushevich, I.V., Loboda, A.V. and Thomson, B.A. (2001). An introduction to quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, **36**, 849-865.
- Coimbra, M.A., Waldron, K.W. and Selvendran, R.R. (1995). Isolation and characterisation of cell wall polymers from the heavily lignified tissues of olive (*Olea europaea*) seed hull. *Carbohydrate Polymers*, **27**, 285-294.
- Coimbra, M.A., Delgadillo, I., Waldron, K.W. and Selvendran, R.R. (1996). Isolation and analysis of cell wall polymers from olive pulp. In Modern methods of plant analysis, New Series Vol. 17, H.F. Linskens e J.F. Jackons (eds.), Springer Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Crescenzi, V. (1995). Microbial Polysaccharides of Applied Interest: Ongoing Research Activities in Europe. *Biotechnology Progress*, **11**, 251-259.
- Curley, A.D. (1993). Paulownia growing rapidly outside Asia. *Journal of Forest*, **91**, 41.
- Daas, P.J.H., Arisz, P.W., Schols, H.A., Ruiter, G.A. De and Voragen, A.G.J. (1998). Analysis of partially methyl-esterified galacturonic acid oligomers by high-

- performance anion-exchange chromatography and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Analytical Biochemistry*, **257**, 195-202.
- Deery, M.J., Stimson, E. and Chappell, C.G. (2001). Size exclusion chromatography/mass spectrometry applied to the analysis of polysaccharides. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **15**, 2273-2283.
- Dlamini, A.M. and Peiris, P.S. (1997). Production of exopolysaccharide by *Sphingomonas paucimobilis* sp. ATCC 31461 (*Pseudomonas elodea*) using whey as fermentation substrate. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **47**, 52-57.
- Ekeberg, D., Knutsen, S.H. and Sletmoen, M. (2001). Negative-ion electrospray ionisation–mass spectrometry (ESI–MS) as a tool for analysing structural heterogeneity in *kappa*-carrageenan oligosaccharides. *Carbohydrate Research*, **334**, 49-59.
- Evtuguin, D.V., Tomás, J.L., Silva, A.M.S. and Neto, C.P. (2003). Characterization of acetylated heteroxylan from *Eucalyptus globules* Labill. *Carbohydrate Research*, **338**, 597-604.
- Fengel, D. and Wegener, W. (1983). Wood chemistry – ultrastructure reactions. *Walter De Gruyter & Co*, Berlin.
- Fernández, L.E. (2007). Introduction to ion trap mass spectrometry: Application to the structural characterization of plant oligosaccharides. *Carbohydrate Polymers*, **68**, 797-807.
- Fialho, A.M., Martins, L.O., Donval, M.-L., Leitaõ, J.H., Ridout, M.J., Jay, A.J., Morris, V.J. and Sá-Correia, I. (1999). Structures and properties of gellan polymers produced by *Sphingomonas paucimobilis* ATCC 31461 from lactose compared with those produced from glucose and from cheese whey. *Applied and Environmental Microbiology*, **65**, 2485-2491.
- Finehout, E.J. and Lee, K.H. (2004). An introduction to mass spectrometry applications in biological research. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, **32**, 93-100.
- Fukuyama, Y., Kolender, A.A., Nishioka, M., Nonami, H., Matulewicz, M.C., Erra-Balsells, R. and Cerezo, A.S. (2005). Matrix-assisted ultraviolet laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3),  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-xylans from *Nothogenia fastigiata* using *nor*-harmane as matrix. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **19**, 349-358.



- Giavasis, I., Harvey, L.M. and McNeil, B. (2006) The effect of agitation and aeration on the synthesis and molecular weight of gellan batch cultures of *Sphingomonas paucimobilis*. *Enzyme and Microbial Technology* **38**, 101-108.
- Gonçalves, A.G., Ducatti, D.R.B., Paranha, R.G., Eugênia, M., Duarte, R. and Nosedá, M.D. (2005). Positional isomers of sulfated oligosaccharides obtained from agarans and carrageenans: preparation and capillary electrophoresis separation. *Carbohydrate Research*, **340**, 2123-2134.
- Griffiths, W.J., Jonsson, A.P., Rai, D.K. and Wang, Y. (2001). Electrospray and tandem mass spectrometry in biochemistry. *Biochemical Journal*, **355**, 545-561.
- Gunning, A.P., Kirby, A.R., Ridout, M.J., Brownsey, G.J. and Morris, V.J. (1996). Investigation of gellan networks and gels by atomic force microscopy. *Macromolecules*, **29**, 6791-6796.
- Gur'janov, O.P., Gorshkova, T.A., Kabel, M., Schols, H.A. and van Dam, J.E.G. (2007). MALDI-TOF MS evidence for linking of flax bast fiber galactan to rhamnogalacturonan backbone. *Carbohydrate polymers*, **67**, 86-96.
- Harris, P. (1990). Food gels. *Elsevier Science Publishers Ltd*, New York, United States of America.
- Harvey, D.J., Bateman, R.H. and Green, M.R. (1997). High-energy collision-induced fragmentation of complex oligosaccharides ionized by Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, **32**, 167-187.
- Harvey, D.J. (2000). Collision-induced fragmentation of underivatized *N*-linked carbohydrates ionized by electrospray. *Journal of Mass Spectrometry*, **35**, 1178-1190.
- Harvey, D.J. (2006). Analysis of carbohydrates and glycoconjugates by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: an update covering the period 1999-2000. *Mass Spectrometry Reviews*, **25**, 595-662.
- Hashimoto, W., Maesaka, K., Sato, N., Kimura, S., Yamamoto, K., Kumagai, H. & Murata, K. (1997). Microbial system for polysaccharide depolymerization: enzymatic route for gellan depolymerization by *Bacillus* sp. GL1. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **339**, 17-23.
- Jacobs, A., and Dahlman, O. (2001a). Characterization of molar masses of hemicelluloses from wood and pulps employing size exclusion chromatography and matrix-assisted

- laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Biomacromolecules*, **2**, 894-905.
- Jacobs, A., Larsson, P.T. and Dahlman, O. (2001b). Distribution of uronic acids in xylans from various species of soft- and hardwood as determined by MALDI mass spectrometry. *Biomacromolecules*, **2**, 979-990.
- Jacobs, A., Lundqvist, J., Salbrand, H., Tjerneld, F. and Dahlman, O. (2002). Characterization of water-soluble hemicelluloses from spruce and aspen employing SEC/MALDI mass spectrometry. *Carbohydrate Research*, **337**, 711-717.
- Jacobs, A., Palm, M., Zacchi, G. and Dahlman, O. (2003). Isolation and characterization of water-soluble hemicelluloses from flax shive. *Carbohydrate Research*, **338**, 1869-1876.
- Jansson, P. E., Lindeberg, B. and Sandford, P. A. (1983). Structural studies of gellan gum, an extracellular polysaccharide elaborated by *Pseudomonas elodea*. *Carbohydrate Research*, **124**, 135-139.
- Jay, A.J., Colquhoun, I.J., Ridout, M.J., Brownsey, G.J., Morris, V.J., Fialho, A.M., Leitão, J.H. and Sá-Correia, I. (1998). Analysis of structure and function of gellans with different substitution patterns. *Carbohydrate Polymers*, **35**, 179-188.
- Jiménez, L., Navarro, E., Pérez, E. and Maester, F. (1997). Disponibilidad, almacenamiento y caracterización de residuos agrícolas para la fabricación de pastas celulósicas para papel. *Investigación y Técnica del Papel*, **131**, 130.
- Jiménez, L., Rodríguez, A., Ferrer, J.L., Pérez, A., and Angulo, V. (2005). La *Paulownia* : una planta de rápido crecimiento como materia prima para la fabricación de papel. *Afinidad*, **62**, 100-105.
- Johnstone, R.A.W. and Rose, M.E. (1996). Mass Spectrometry for Chemists and Biochemists. 2<sup>nd</sup> Edition, *Cambridge University Press*, Great Britain.
- Kabel, M.A., Schols, H.A. and Voragen, A.G.J. (2001). Mass determination of oligosaccharides by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry following HPLC, assisted by on-line desalting and automated sample handling. *Carbohydrate Polymers*, **44**, 161-165.
- Kabel, M.A., Schols, H.A. and Voragen, A.G.J. (2002). Complex xylo-oligosaccharides identified from hydrothermally treated *Eucalyptus* wood and brewery's spent grain. *Carbohydrate Polymers*, **50**, 191-200.

- Kabel, M.A., de Waard, P., Schols, H.A. and Voragen, A.G.J. (2003). Location of *O*-acetyl substituents in xylo-oligosaccharides obtained from hydrothermally treated *Eucalyptus* wood. *Carbohydrate Research*, **338**, 69-77.
- Kalaycioglu, H., Deniz, I. and Hiziroglu, S. (2005). Some of the properties of particleboard made from *Paulownia*. *Journal of Wood Science*, **51**, 410-414.
- Kang, K.S., Veeder, G.T., Mirrasoul, P.J., Kaneko, T. and Cottrell, I.W. (1982). Agar-like polysaccharide produced by a *Pseudomonas* species: production and basic properties. *Applied and Environmental Microbiology*, **43**, 1086-1091.
- Karas, M. and Hillenkamp, F. (1988). Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10 000 Daltons. *Anal. Chem.*, **60**, 2299-2301.
- Kato, K., Yamaguchi, Y., Takahashi, N., Nishimura, M, Iwamoto, S.-i., Sekiya, S. and Tanaka, K. (2004). Discrimination of isomeric fragment ions observed in Tandem Mass Spectra of biantennary oligosaccharides by use of selective isotope labelling. *Journal of the Mass Spectrometry Society of Japan*, **52**, 284-288.
- Kicman, A.T., Parkin, M.C. and Iles, R.K. (2007). An introduction to mass spectrometry based proteomics – Detection and characterization of gonadotropins and related molecules. *Molecular and Cellular Endocrinology*, **260-262**, 212-227.
- Körner, R., Limberg, G., Christensen, T.M.I.E., Mikkelsen, J.D. and Roepstorff, P. (1999). Sequencing of Partially Methyl-Esterified Oligogalacturonates by Tandem Mass Spectrometry and Its Use To Determine Pectinase Specificities. *Analytical Chemistry*, **71**, 1421-1427.
- Kuo, M-S., Mort, A. J. and Dell, A. (1986). Identification and location of L-glycerate, an unusual acyl substituent in gellan gum. *Carbohydrate Research*, **156**, 173-187.
- Lee, Y.C. (1996). Carbohydrate analysis with high-performance anion-exchange chromatography. *Journal of Chromatography A*, **720**, 137-149.
- Lindeberg B. and Lonngren J. (1978). Methylation analysis of complex carbohydrates: general procedure and application for sequence analysis. *Methods in Enzymology*, **50**, 3-33.
- Lindon, J., Holmes, J. and Tranter, G. (2000). Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry, Vol. 1, Part-2. *Academic Press*, pag. 1241-1248.
- March, R.E. (1997). An Introduction to Quadrupole Ion Trap Mass Spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, **32**, 351-369.

- Maslen, S.L., Goubet, F. Adam, A., Dupree, P. and Stephens, E. (2007). Structural elucidation of arabinoxylan isomers by normal phase HPLC-MALDI-TOF/TOF-MS/MS. *Carbohydrate Research*, **342**, 724-735.
- Mazen, F., Milas, M. and Rinaudo, M. (1999). Conformational transition of native gellan. *International Journal of Biological Macromolecules*, **26**, 109-118.
- Mazumder, S., Lerouge, P., Loutelier-Bourhis, C., Driouich, A. and Ray, B. (2005). Structural characterisation of hemicellulosic polysaccharides from *Benincasa hispida* using specific enzyme hydrolysis, ion exchange chromatography and MALDI-TOF mass spectrometry. *Carbohydrate Polymers*, **59**, 231-238.
- Moorhouse, R., Colegrove, G.T., Sandford, P.A., Baird, J.K. and Kang, K.S. (1981). Solution Properties of Polysaccharides. In: *Brant DA, editor*. ACS Symposium series No. 150, pag. 111.
- Nunes, F.M., Domingues, M.R. and Coimbra, M.A. (2005). Arabinosyl and glucosyl residues as structural features of acetylated galactomannans from green and roasted coffee infusions. *Carbohydrate Research*, **340**, 1689-1698.
- Nunes, F.M., Reis, A., Domingues, M.R. and Coimbra, M.A. (2006). Characterization of galactomannan derivatives in roasted coffee beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54**, 3428-3439.
- Olson, J.R., Carpenter, S.B., (1985). Specific gravity, fiber length, and extractive content of young *Paulownia*. *Wood and Fiber Science*, **17**, 428-438.
- Pfenninger, A., Karas, M., Finke, B. and Stahl, B. (2002). Structural analysis of underivatized neutral human milk oligosaccharides in the negative ion mode by nano-electrospray MS<sup>n</sup>. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, **13**, 1331-1340.
- Pollock, T.J (1993). Gellan related polysaccharides and the genus *Sphingomonas*. *Journal of General Microbiology*, **139**, 1939-1945.
- Reinhold, V.N. (1987). Direct chemical ionization mass spectrometry of carbohydrates. *Methods in Enzymology*, **138**, 59-84.
- Reinhold, V.N., Reinhold, B.B. and Costello, C.E. (1995). Carbohydrate molecular weight profiling, sequence, linkage and branching data: ESMS and CID. *Analytical Chemistry*, **67**, 1772-1784.

- Reinhold, V.N., Reinhold, B.B. & Chan, S. (1996). Carbohydrate sequence analysis by electrospray ionization-mass spectrometry. *Methods of Enzymology*, **271**, 377-402.
- Reis, A., Coimbra, M.A., Domingues, P., Ferrer-Correia, A., Domingues, M.R.M. (2002). Structural characterization of underivatized olive pulp xylo-oligosaccharides by mass spectrometry using matrix-assisted laser desorption/ionisation and electrospray ionisation. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **16**, 2124-2132.
- Reis, A., Domingues, M.R.M., Domingues, P. Ferrer-Correia, A.J. and Coimbra, M.A. (2003). Positive and negative electrospray ionisation tandem mass spectrometry as a tool for structural characterisation of acid released oligosaccharides from olive pulp glucuronoxylans. *Carbohydrate Research*, **338**, 1497-1505.
- Reis, A., Pinto, P., Coimbra, M.A., Evtuguin, D.V., Neto, C.P., Ferrer-Correia, A.J. and Domingues, M.R.M. (2004). Structural differentiation of uronosyl substitution patterns in acidic heteroxylans by electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, **15**, 43-47.
- Reis, A., Pinto, P., Evtuguin, D.V., Neto, C.P., Domingues, P., Ferrer-Correia, A.J. and Domingues, M.R.M. (2005). Electrospray tandem mass spectrometry of underivatized acetylated xylo-oligosaccharides. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **19**, 3589-3599.
- Richau, J.A., Choquenot, D., Fialho, A.M. & Sá-Correia, I. (1997). Emergence of Cu<sup>++</sup>-tolerant mutants defective in gellan synthesis in Cu<sup>++</sup>-stressed cultures of *Sphingomonas paucimobilis*. *Res. Microbiol.*, **148**, 251-261.
- Sá-Correia, I., Fialho, A.M., Videira, P., Moreira, L.M., Marques, A.R. and Albano, H. (2002). Extracellular polysaccharides review. Gellan gum biosynthesis in *Sphingomonas paucimobilis* ATCC 31461: genes, enzymes and exopolysaccharide producing engineering. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **29**, 170-176.
- Samuelsen, A.B., Cohen, E.H., Paulsen, B.S., Brüll, L.P. and Thomas-Oates, J.E. (1999). Structural studies of a heteroxylan from *Plantago major* L. seeds by partial hydrolysis, HPAEC-PAD, Methylation and GC-MS, ESMS and ESMS-MS. *Carbohydrate Research*, **315**, 312-318.

- Shatalov, A., Evtuguin, D.V. and Neto, C.P. (1999). (2-*O*- $\alpha$ -D-Galactopyranosyl-4-*O*-methyl- $\alpha$ -D-glucurono)-D-xylan from *Eucalyptus globulus* Labill. *Carbohydrate Research*, **320**, 93-99.
- Sheeley, D. and Reinhold, V. (1998). Structural characterization of carbohydrate sequence, linkage, and branching in a quadrupole ion trap mass spectrometer: neutral oligosaccharides and N-linked glycans. *Analytical Chemistry*, **70**, 3053-3059.
- Shimizu, K. (1991). Wood and Cellulosic Chemistry. *Marcel Dekker*, New York.
- Silvestre, A.J.D., Evtuguin, D.V., Sousa, A.P.M. and Silva, A.M.S. (2005). Lignans from a hybrid *Paulownia* wood. *Biochemical Systematics and Ecology*, **33**, 1298-1302.
- Skoog, D.A, Holler, F.J. and Nieman, T.A. (1998). Principles of Instrumental Analysis, 5<sup>th</sup> edition, Harcourt Brace and Company, United States of America.
- Sleno, L. and Volmer, D.A. (2004). Ion activation methods for tandem mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, **39**, 1091-1112.
- Sutherland, I.W. (1998). Novel established applications of microbial polysaccharides. *Trends Biotechnonology*, **16**, 41-46.
- Sutherland, I.W. (1997). Microbial exopolysaccharides-structural subtleties and their consequences. *Pure and Applied Chemisry*, **69**, 1911-1917.
- Sutherland, I.W. (1994). Structure-function relationships in microbial exopolysaccharides. *Biotechnology Advances*, **12**, 393-448.
- Teleman, A., Lundqvist, J. Tjerneld, F., Stalbrand, H. and Dahlman, O. (2000). Characterization of acetylated 4-*O*-methylglucuronoxylan isolated from aspen employing <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectroscopy. *Carbohydrate Research*, **329**, 807-815.
- Teleman, A., Tenkanen, M., Jacobs, A. and Dahlman, O. (2002). Characterization of *O*-acetyl-(4-*O*-methylglucurono) xylan isolated from birch beech. *Carbohydrate Research*, **337**, 373-377.
- Teleman, A., Nordström, M., Tenkanen, M., Jacobs, A. and Dahlman, O. (2003). Isolation and characterization of *O*-acetylated glucomannans from aspen and birch wood. *Carbohydrate Research*, **338**, 525-534.
- van Hazendonk, J.M., Reinerink, E.J.M., de Waard, P. and van Dam, J.E.G. (1996). Structural analysis of acetylated hemicellulose polysaccharides from fibre flax (*Linum usitatissimum* L.), *Carbohydrate Research*, **291**, 141-154.

- Watson, J.T. (1985). Introduction to Mass Spectrometry. 2<sup>nd</sup> edition. *Raven Press Books, Ltd.* United States of America.
- Weiskopf, A.S., Vouros, P. and Harvey, D.J. (1998). Electrospray ionization-ion trap mass spectrometry for structural analysis of complex n-linked glycoprotein oligosaccharides. *Analytical Chemistry*, **70**, 4441-4447.
- Wilson, P.J., Howlin, B.J. and Webb, G.A. (1996). Nuclear shielding calculations on the primary structure of gellan polysaccharide. *Journal of Molecular Structure*, **385**, 185-193.
- Wysoki, V.H., Resing, K.A., Zhang, Q. and Cheng, G. (2005). Mass spectrometry of peptides and proteins. *Methods*, **35**, 211-222.
- Xue, J., Song, L., Khaja, S.S., Locke, R.D., West, C.M., Laine, R.A. and Matta, K.L. (2004). Determination of linkage position and anomeric configuration in Hex-Fuc disaccharides using electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **18**, 1947-1955.
- Zaia, J. and Costello, C.E. (2001). Composition analysis of glycosaminoglycans by electrospray mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, **73**, 233-239.
- Zaia, J. (2004), Mass Spectrometry of oligosaccharides. *Mass Spectrometry Reviews*, **23**, 161-227.
- Zenobi, R. and Knochenmuss, R. (1998). Ion formation in MALDI mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*, **17**, 337-366.
- <http://www.waters.com/WatersDivision/pdfs%5Cms%20primer.pdf?ref=JDRS-5LTGBX>